

CHEMIESE KARAKTERISERING VAN DIE PREORBITALE AFSKEIDING VAN DIE SUNI-OOI, *NEOTRAGUS MOSCHATUS*

deur

ANENA SPIES



Tesis ingelewer vir gedeeltelike voldoening aan die vereistes vir die graad van
MAGISTER IN NATUURWETENSKAPPE in Chemie aan die Universiteit van
Stellenbosch.

Promotor:
Prof. B. V. Burger
Medepromotor:
Dr. M. le Roux

Stellenbosch
Januarie 2001

VERKLARING

Ek, die ondergetekende, verklaar hiermee dat die werk in hierdie tesis vervat, my eie oorspronklike werk is wat nog nie vantevore in die geheel of gedeeltelik by enige ander universiteit ter verkryging van 'n graad voorgelê is nie.

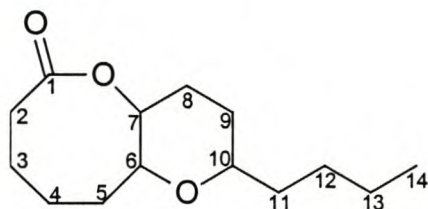
OPSOMMING

As gevolg van die beskadiging van landerye, boorde, plantasies en wingerde deur verskeie klein anteloopspecies, veral die grysbok, *Raphicerus melanotis*, is 'n navorsingsprojek begin om die moontlike beheer van hierdie diere met behulp van spesie-spesifieke sintetiese feromone te ondersoek. Indien die komponente wat vir territoriale afbakening gebruik word, geïsoleer en geïdentifiseer kan word, sou die aktiewe komponente of soortgelyke verbindings moontlik gesintetiseer en gebruik kon word om die diere te beheer en hulle byvoorbeeld uit wingerde, boorde, landerye en plantasies te hou. Probleme is ondervind met die biologiese evaluering van die komponente van die preorbitale afskeiding van die grysbok en meer kennis aangaande die chemiese ekologie van hierdie tipe diere is dus nodig voor verdere pogings tot biologiese evaluering of die beheer van probleemdiere aangewend kan word. Dit kan onder andere bereik word deur die samestelling van afscheidings van naverwante diere te vergelyk. Aangesien die preorbitale klier by die meeste van hierdie spesies 'n belangrike rol in territoriale afbakening speel, is die karakterisering van die preorbitale klierafskeiding dus essensieel in hierdie navorsingsprogram.

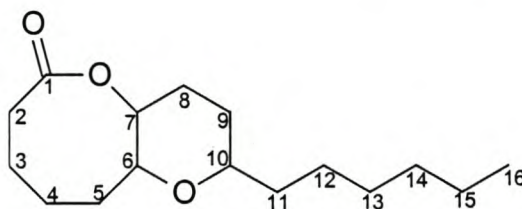
Die suni, *Neotragus moschatus*, is een van die kleinste anteloopspecies en kom in droë ruigtes en digte struikgewasse in die oostelike dele van Afrika voor. Hulle beweeg alleen of in groepies (een ram en 'n paar ooie) en alhoewel beide die ram en die ooi hul preorbitale afscheidings gebruik om hul gebied af te baken, is dit hoofsaaklik die ram se verantwoordelikheid. Tydens 'n vorige ondersoek is die vlugtige verbindings in die preorbitale afskeiding van die ram redelik volledig gekarakteriseer en 83 verbindings geïdentifiseer. In die betrokke studie is getoon dat die preorbitale afscheidings van die ram en die ooi aansienlik verskil. Vergelyking van gaschromatogramme van die onderskeie afscheidings wat onder soortgelyke omstandighede opgeneem is, toon duidelike verskille in kwantiteit en samestelling. Die verskil kan waarskynlik toegeskryf word aan die feit dat die preorbitale afskeiding by die

suni onder andere gebruik word vir territoriale afbakening van gebiede en deur spesifiek die ram.

In die huidige projek is die preorbitale afskeiding van die suni-ooi so volledig moontlik ondersoek. 'n Totaal van 45 verbindings, wat onder meer hidroksiësters, versadigde karboksiëlsure (vertak en onvertak), onversadigde karboksiëlsure, bensoësuur, skwaleen, α -tokoferol en twee steroïede insluit, is geïdentifiseer. Een van die hoofkomponente van die afscheidings is cholesterol en die ander twee hoofkomponente het elkeen 'n basispiek by m/z 153 en daar is dus aangeneem dat hulle homoloë van mekaar is. Die strukture van hierdie twee en ander homoloë wat in kleiner hoeveelhede in die afscheidings aanwesig is, is met behulp van analitiese metodes soos GC, GC-MS, GC-IR, CI-GC-MS, HRMS, HPLC en KMR (^1H -, ^{13}C -, APT-, DEPT-, 2D COSY-, 2D HMBC-, 2D HSQC- en 1D TOCSY-analises) bepaal. Komponent 5009 en 5642 is geïdentifiseer as bisikliese verbindings met die volgende strukture:



Komponent 5009



Komponent 5642

Na vergelyking van die retensietye en molekulêre massas van die ander komponente in die homoloë reeks is die ander komponente met 'n basispiek by m/z 153 tentatief as soortgelyke verbindings met langer en korter koolstofkettings geïdentifiseer.

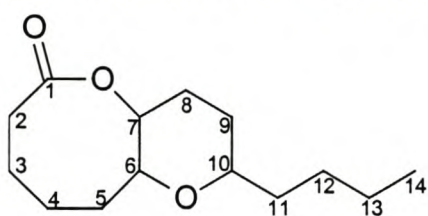
SUMMARY

Serious damage to orchards, plantations and vineyards by small antelope species, especially the grysbok, *Raphicerus melanotis*, has lead to the initiation of a research project in which the possible control of these animals by means of species-specific synthetic pheromones was investigated. If the active components responsible for territorial marking can be isolated and identified, they could be synthesized and used to restrict the migration of these animals into vineyards, orchards and plantations. Problems was experienced with the biological evaluation of the active constituents of the preorbital secretion of the grysbok and it was decided that more inofrmation on the chemical ecology of these animals would be necessary before further attempts were made at the biological evaluation of the constituents of their exocrine secretions. It was attempted to achieve this by comparing the composition of secretions of related animals. Since the preorbital gland plays an important role in the territorial marking of most of these animals, the characterization of their preorbital secretions is essential in this research program.

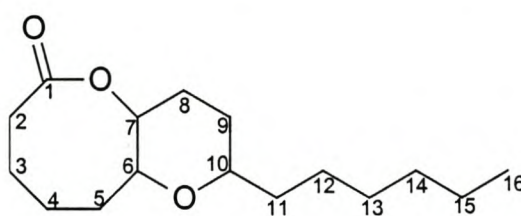
The suni, *Neotragus moschatus*, is one of the smallest antelope species and is found in dry thickets and thick shrubs in the eastern parts of Africa. They occur alone or in small groups of one male and a few females, and while both the male and the female use their preorbital secretions to mark their territory it is mainly the responsibility of the male. In a previous study the organic constituents of the preorbital secretion of the suni male was characterized rather extensively and 83 compounds were identified. That study revealed that there are considerable quantitative and especially qualitative differences between the preorbital secretions of males and females. This difference can probably be attributed to the fact that the male is the dominant territorial marker in the clan.

In the present project the preorbital secretion of the suni female was investigated as extensively as possible. A total of 45 compounds were

identified, including hydroxyesters, saturated carboxylic acids (branched and unbranched), unsaturated carboxylic acids, benzoic acid, squalene, α -tocopherol and steroids of which cholesterol is one of the three major constituents of the secretion. The two other major constituents each has a base peak at m/z 153 and were thought to be homologues. These two compounds and several other homologues were identified in the secretion using *inter alia* GC, GC-MS, GC-IR, CI-GC-MS, HRMS, HPLC and NMR (^1H -, ^{13}C -, APT-, DEPT-, 2D COSY-, 2D HMBC-, 2D HMQC-, 1D TOCSY-analyses). Eventually component 5009 and 5642 were identified as bicyclic structures with the following structures:



Komponent 5009



Komponent 5642

Comparison of the retention times of these two components with those of the other components in the homologous series, the other components with a base peak at m/z 153 were tentatively identified as compounds with a similar structure, but different carbon chain lengths.

INHOUDSOPGAWE

HOOFSTUK 1

INLEIDING EN DOELSTELLING	1
DIE AFSKEIDING VAN SEMIOCHEMIKALIEë	5
DIE WAARNEMING VAN SEMIOCHEMIKALIEë	7
Die Olfaktoriese Sisteem	9
Die Vomeronasale Orgaan	12
ARTIODACTYLA	14
Preorbitale afskeidings van verskeie bokspesies	16
DOELSTELLING	20
Verwysings: Hoofstuk 1	22

HOOFSTUK 2

CHEMIESE KARAKTERISERING VAN DIE PREORBITALE KLIERAFSKEIDING VAN DIE SUNI-OOI, <i>NEOTRAGUS MOSCHATUS</i>	29
CHEMIESE KARAKTERISERING VAN DIE PREORBITALE AFSKEIDING	32
Alifatiese Hidroksiësters	34
Alifatiese Hidroksibutanoate	34
Alifatiese Hidroksipentanoate	38
Onvertakte Alifatiese Karboksiëlsure	42
Versadigde sure	42
Onversadigde sure	44
Vertakte Alifatiese Karboksiëlsure	45
Bensoësuur	48
Skwaleen	49
α -Tokoferol/Vitamien E	49
Steroïede	51

Hoofkomponente	52
Gaschromatografie-Massaspektrometrie	52
Chemiese Ionisasie Massaspektrometrie	53
Gaschromatografie-Infrarooispektrometrie	53
Kern Magnetiese Resonansie (KMR)	55
¹³ C-KMR simulasies	55
Isolering deur middel van ekstraksie met 'n basis	61
Hoëdruk Vloeistofchromatografie	63
HEROORWEGING VAN BESKIKBARE EN NUWE DATA	65
Hoë Resolusie Massaspektrometrie	65
KMR-Spektrometrie en –Simulasies	66
Verwysings: Hoofstuk 2	166
 HOOFSTUK 3	 170
EKSPERIMENTEEL	170
VERSAMELING EN MONSTERVOORBEREIDING	170
ANALITIESE TEGNIEKE	171
Gaschromatografiese Analise	171
Gaschromatografie-Massaspektrometrie	171
Chemiese Ionisasie Massaspektrometrie	172
Gaschromatografie-Infrarooispektroskopie	172
Hoëdruk Vloeistofchromatografie	172
Kern Magnetiese Resonansie	173
Hoë Resolusie Massaspektrometrie	173
ISOLERING VAN SURE DEUR MIDDEL VAN SOUTVORMING	173
VERWYSINGS: HOOFSTUK 3	174

BEDANKINGS

Hiermee wil ek my opregte dank en waardering aan die volgende persone en instansies uitspreek:

- Prof. B. V. Burger, vir hulp, geduld en leiding met die navorsing en die skryf van die tesis.
- Dr. M. le Roux, vir gedurige en geduldige hulp en raad tydens die projek.
- Mev. W. J. G. Burger vir maak van die kolomme, vriendelikheid en ondersteuning.
- Mnr. H. S. C. Spies (oorlede 21/12/00), vir KMR-opnames en -interpretasie.
- Prof. K. L. Koch, P. Celliers en E. Maree vir hulp met KMR-data.
- Dr. M. W. Bredenkamp vir hulp met KMR-interpretasie.
- Prof. H. Lauer, vir die gebruik van en hulp met die HPLC.
- Mnr. R. J. Hall van *Tygerberg Dieretuin*, vir bereidwilligheid en hulp met die vang van die suni's en die versamel van monsters.
- Me. V. Truter, vir die opneem van HRMS.
- Dr. J. Dry van *Rupert International*, vir die GC-FTIR-opnames.
- Mnr. J. Rodrigues, vir die aanstuur van skyfies en toestemming vir die gebruik van foto's in die tesis.
- Die SNO, Harry Crossley en Prof. B. V. Burger vir finansiële ondersteuning.
- Die WNNR, Textek.
- Des, Tertia, Stefan en ander kollegas in die laboratorium.
- Ronel, Hester, Chris, Bjorn, Attie, Francois (oorlede 11/09/1999), Heidi, Roché, Marius, Ris, Adèle en SkolPerts vir ondersteuning, veral die laat aande in die lab.
- Mariska, Craig, Bernard en Stephan vir hulp en geduld.
- Pa en Ma, vir ondersteuning, liefde en aanmoediging.

HOOFSTUK 1

INLEIDING EN DOELSTELLING

Om te ruik moet mens inasem, om te sien moet mens kyk en om te voel moet mens aanraak. Sensoriese persepsies is dus duidelik 'n aktiewe proses wat sistematiese interaksies tussen onderwerp en stimulus behels¹. Die ontvangs van chemiese seine is van die vroegste sensoriese meganismes wat ooit in lewende organismes ontwikkel het. Dit blyk byvoorbeeld uit die vermoë van primitiewe bakterieë en protosoë wat lank gelede reeds tussen verskillende chemiese stowwe kon onderskei².

Chemiese seine speel 'n essensiële rol in die uitkenning van lede van die betrokke spesie, die bepaling onderling van individue se geslag en sosiale status, die herkenning van ander spesies, territoriale- en paringsgedrag, kommunikasie van inligting tydens stres- en alarmsituasies, asook in die opsporing van voedsel³.

Die term chemiese ekologie is redelik onlangs geskep en verwys na die interaksie van lewende organismes met mekaar en die omgewing waarin hulle voorkom, deur middel van chemiese stowwe wat hulle produseer. Die term semiochemie is afgelei van die Griekse woord *semeion* wat 'sein' beteken en behels die studie van die verbindings, sogenaamde *semiochemikalieë*, wat gebruik word om inligting tussen organismes onderling of tussen organismes en hul omgewing oor te dra⁴.

Die semiochemiese verbindings wat vir die oordrag van inligting tussen verskillende spesies verantwoordelik is, staan as *allelochemikalieë* bekend⁴ en kan in twee kategorieë verdeel word. Die aktiewe komponente van afskeidings wat byvoorbeeld deur kewers afgeskei word om hulle teen hul vyande te beskerm en wat onwelriekend, irriterend of giftig kan wees, is voorbeelde van *allomone*⁵. Allomone is dus semiochemiese verbindings wat die spesie wat die verbindings vrystel, bevoordeel. Semiochemiese verbindings wat tot die waarnemer se voordeel gebruik word, staan as *kairomone* bekend. Dit is moontlik dat 'n kairomoon nie primêr kommunikasie met die ontvangende spesie ten doel het nie, maar dat die ontvangende spesie dit wel tot sy voordeel uitbuit. 'n Goeie voorbeeld van die aanwending van so 'n kairomoon is wanneer 'n roofdier sy prooi opspoor deur die waarneming van die reuk van die prooi.

Hierteenoor kan die geur van 'n blom wat deur bye wat stuifmeel en nektar soek gebruik word om die blom op te spoor, en dus 'n kairomoon is, ook as 'n allomoon beskou word aangesien dit voordelige bestuiwing van die blom deur bye inhou.

Semiochemiese kommunikasie is egter veel meer kompleks en 'n verbinding of mengsel van verbindings kan byvoorbeeld as 'n feromoon (sien later) optree terwyl die afskeiding van die feromoon deur 'n ander spesie, as allomoon, tot sy voordeel uitgebuit kan word. 'n Goeie voorbeeld van hierdie verskynsel is die aanlokking van mannetjie-motte deur die Amerikaanse bolas spinnekop, wat 'n allomoon met dieselfde chemiese struktuur as die sekslokstof van die betrokke motspesie afskei^{4,6}.

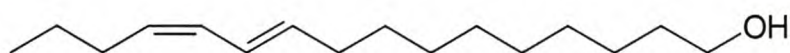
Semiochemikalieë wat betrokke is by oordrag van inligting tussen lede van dieselfde spesie, staan as *feromone* bekend. Feromone is meestal verbindings wat eksokrien, dit wil sê na buite, deur 'n organisme afgeskei word om die gedrag of fisiologie van 'n lid van dieselfde spesie te beïnvloed⁷. Die effek van feromone kan varieer van langtermyn, onomkeerbare fisiologiese reaksies tot spesifieke, feitlik onmiddellike gedragspatroonveranderings^{8,9}. Na aanleiding van hierdie verskillende gedragspatrone, is feromone in 1963 deur Wilson en Bossert¹⁰ geklassifiseer as afsetter- en vrystellerferomone. Eersgenoemde het 'n langtermyn fisiologiese verandering van die endokrien- en reproduksiesisteme van die ontvanger tot gevolg. By soogdiere het afsetterferomone onder andere estrum-onderdrukking (Lee-Boot Effek), estrum-stimulering (Whitten-effek), swangerskap-inhibering (Bruce-effek) en 'n stres-sindroom (Ropartz-effek), tot gevolg¹¹. Vrystellerferomone, aan die ander kant, het 'n onmiddellike gedragsreaksie tot gevolg. Sekslokstowwe, alarm- en aggregasie-feromone van soogdiere en veral insekte is voorbeelde van vrystellerferomone.

'n Feromoon kan egter ook 'n tweeledige rol speel deur sowel afsetter- en vrysteller-funksies te vervul, gelyktydig of agtereenvolgens in dieselfde of verskillende individue¹¹. Die kompleksiteit van feromone verskil aansienlik van organisme tot organisme en hang grootliks van die waarnemings- en interpretasievermoë van die organisme af.

Die senuweesisteem van insekte bestaan uit 'n groot aantal neurone, in die orde van 10^6 , terwyl dit by rotte en muise in die orde van omtrent 10^9 is. Die ander duidelike verskil tussen die twee tipes senuweestelsels het te doen met die graad van

breinontwikkeling, die relatiewe aantal geassosieerde senuwees, en die aanpasbaarheid van die gevolglike gedrag¹². As gevolg van die klein aantal neurone by insekte, is hul gedrag grootliks rigied, geneties vooraf bepaal en 'n spesifieke reaksie op 'n bepaalde stimulus wat baie min variasie toelaat. Die vrysteller-konsep, feromoon-gewys of andersins, verskaf 'n uitstekende verklaring vir die relatief eenvoudige stimulus-respons-sisteme wat die sosiale gedrag van hierdie organismes bepaal. Baie insekferomone bestaan uit enkele verbindings of eenvoudige mengsels van verbindings, wat deur kliere uitgeskei word en stereotipiese reaksies ontlok¹³.

Die eerste feromoon wat chemies geïdentifiseer is, bombykol ((10*E*, 12*Z*)-heksadeka-diën-1-ol)^{2,14,15}, word geproduseer word in die abdominale kliere van die wyfie sywurm mot, *Bombyx mori*^{2,14}.



(10*E*, 12*Z*)-heksadeka-diën-1-ol

Intussen is talle komplekse en ander eenvoudige insekferomone geïdentifiseer. By verskeie heuningbysoorte is onder andere linalool, linalooloksied, hidroksisure, asetate, ketone, onversadigde alkohole en reguitketting-koolwaterstowwe as feromone geïdentifiseer^{2,5,16,17}. Meer komplekse insekferomoon-sisteme is dié van die miskruiers van die genus *Kheper* waar elk van vier spesies van 'n unieke mengsel van komponente gebruik maak. Die abdominale afskeiding van *Kheper subaeneus* bevat byvoorbeeld skatool en (*E*)-2,6-dimetiel-6-okten-2-ol as EAD-aktiewe komponente¹⁸, dit wil sê komponente wat deur 'n elektroantennografiese detektor (EAD) waargeneem kan word. Die EAD is 'n gaschromatografiese detektor wat 'n insek-antenne as waarnemingselement het en gebruik word vir die kontinueerlike monitering van feromone en ander komponente met olfaktoriese aktiwiteit wat met behulp van gaschromatografie geskei word¹⁹. Die feromoonsisteme van hierdie insekte is nogtans relatief eenvoudig in vergelyking met die kompleksiteit van feromoon-afscheidings van soogdiere.

Soogdiere, in teenstelling met die meeste insekte, reageer nie noodwendig met 'n standaardreaksie op 'n stimulus nie. Die semiochemiese afscheidings van soogdiere is

gewoonlik baie meer kompleks en alhoewel die resulterende gedrag waarskynlik hoofsaaklik instinktief is, kan dit varieer na gelang van die konteks waarin 'n bepaalde semiochemiese boodskap ontvang word. Sover bekend is die eerste soogdierstowwe, sivetoon en muskoon, in 1926 deur Ruzicka uit afskeidings van die sivetkat, *Viverra civetta*, en die muskushert, *Moschus moschiferus* onderskeidelik geïsoleer^{20,21}. Die afskeidings van hierdie diere en ook kastoreum van die bewer, *Castor fiber*, word lankal reeds in duur soorte parfuum gebruik.

Party soogdiere het die vermoë om hulle reaksies op 'n sekere stimulus aan te pas deur middel van leerprosesse²². Selfs al is hulle in staat tot 'n hoë graad van aangeleerde gedrag, speel chemiese seine steeds 'n essensiële rol in kommunikasie en moet die dier die sein herken te midde van 'n komplekse, driedimensionele en verwarrende chemiese omgewing. Die chemiese identifikasie van 'n vrygestelde chemiese sein wat 'n spesifieke gedrag ontlok, kan dit in sekere gevalle moontlik maak om die vrystelling daarvan te volg en die betrokke reseptormeganismes te verklaar.

Die kompleksiteit van chemosensoriese kommunikasie strek verder as slegs die chemiese sy daarvan. Vorige ondervinding, die hormonale en fisiologiese toestand van die dier, individuele herkenning, gewoontes, kondisionering en die omgewing speel bepaald 'n rol om inter- en intraspesifieke kommunikasie by soogdiere nog verder te kompliseer^{3,22-24}. Dieselfde eindresultaat kan byvoorbeeld bereik word, maar na gelang van die konteks, mag die gedragspatroon wat lei tot die uiteindelijke resultaat moontlik varieer. Die aanwesigheid van 'n roofdier mag byvoorbeeld verskillende reaksies by sy prooi ontlok. Indien die prooi nie goed sigbaar is nie of goed gekamouflêer is, sal dit bewegingloos bly staan terwyl dit sal probeer vlug indien dit maklik waargeneem kan word²⁴. Die klassifikasie van feromone is ook moontlik effens verwarrend, aangesien die klassifikasie van 'n stof as 'n seksferomoon, nie uitsluit dat dit in sommige gevalle as alarmferomoon kan optree nie. Die reaksie op die waarneming van 'n bepaalde verbinding mag dus verskil, afhangend van die ontvanger en die omstandighede waaronder die boodskap ontvang word. Die reuk van gebrande hout sal byvoorbeeld 'n ander reaksie ontlok by mense wat honger, koud, of verlore in die bos is, as by teatergangers in 'n oorvol teater nadat iemand "brand" geskree het. So word die sein gekoppel aan ander informasie, in 'n bepaalde konteks geïnterpreteer en daarvolgens gereageer²³.

DIE AFSKEIDING VAN SEMIOCHEMIKALIEË

Die afskeiding van semiochemikalieë vind op verskeie maniere plaas. Vanweë die vele verskille tussen insekte en soogdiere is dit ook hier nodig om die afskeiding van semiochemikalieë tussen die eksoskelet-verwante diere en die gewerweldes afsonderlik te bespreek.

By insekte word semiochemikalieë hoofsaaklik afgeskei deur gespesialiseerde kliere wat op feitlik alle liggaamsdele van insekte kan voorkom²⁵. By wyfies van die Lepidoptera kom die kliere, wat veral sekslokstowwe vrystel, gewoonlik as gespesialiseerde selle tussen die agste en negende abdominale segmente voor. Hare aan die onderkant van die wyfie se abdomen bevorder die vervlugting van die lokstof, terwyl die afscheidings van die mannetjie in kliere op die lyf of vlerke vervaardig word. Die eenvoudigste van hierdie tipe kliere is harig, met een of talle kanale, of die oppervlakte van die klier is oortrek met openinge soos 'n sif. By die meeste insekte word soortgelyke kliere gevind en feromone word byvoorbeeld vrygestel wanneer 'n oppervlakmembraan van die klier tussen segmente blootgestel word deur spiersametrekking. Die verspreiding van lokstowwe word soms aangehelp deur die vinnige beweging van die vlerke of deur hare wat as verdampingsoppervlakte dien²⁶.

Net soos by insekte waar semiochemiese verbindings hoofsaaklik deur gespesialiseerde kliere vervaardig word, word sulke verbindings by soogdiere deur gespesialiseerde kliere, en verder ook deur die vel, mikrobiese werking, en in die urine, faeces en speeksel, geproduseer.

Die struktuur van die vel is sodanig dat afscheidings gelewer word deur die epidermis. Die vel bestaan hoofsaaklik uit drie lae naamlik die epidermis, wat geen bloedvate bevat nie, die dermis wat senuwees en bloedvate bevat en onder andere die epidermis van voedingstowwe voorsien en derdens 'n binneste laag wat bestaan uit onderhuidse vetweefsel. Drie tipes velkliere kom voor, naamlik vet-, apokriene- en ekkriene-kliere. Vetkliere kom voor in alle soogdiere behalwe walvisse en dolfyne en word gewoonlik geassosieer met haarfollikels. Vetkliere produseer 'n olierige vloeistof wat sebum genoem word. Apokriene kliere is sweetkliere waarvan die strukture kan verskil, maar met dieselfde afscheidingsmeganisme. Aanvanklik is geglo dat die boonste selle van die

klier afbreek en as afskeiding dien. Deesdae word die afskeidingsproses gesien as kenmerkend van 'n ekkriene klier, maar dit is steeds sinvol om hierdie kliere nog saam te groepeer en hulle te onderskei van ekkriene- en vetkliere. 'n Tipiese apokriene klier bestaan uit 'n gekronkelde buis wat in die dermis en soms selfs die onderhuidse vetlaag ingebed is en waarvan die binnekant van die buis met afscheidingsweefsel uitgevoer is. 'n Buis lei tot 'n kanaal van die vetklier wat na buite uitmond. By die meeste spesies is die apokriene klier hoofsaaklik onder die beheer van sekshormone. Die struktuur van ekkriene kliere verskil aansienlik tussen verskillende spesies. 'n Algemene kenmerk is egter dat die gekronkelde afscheidingsbuis in die dermis en moontlik die onderhuidse vetlaag ingebed is, met 'n buis wat direk na die veloppervlak lei en nie met 'n haarfollikel geassosieer word nie. Ekkriene sweetkliere word onwillekeurig deur senuwees beheer²⁷. Dit is moeilik om die bydraes van die verskillende kliere tot 'n spesifieke afskeiding te klassifiseer, aangesien hulle op die veloppervlak kan meng en as 'n lagie water en vette waargeneem kan word.

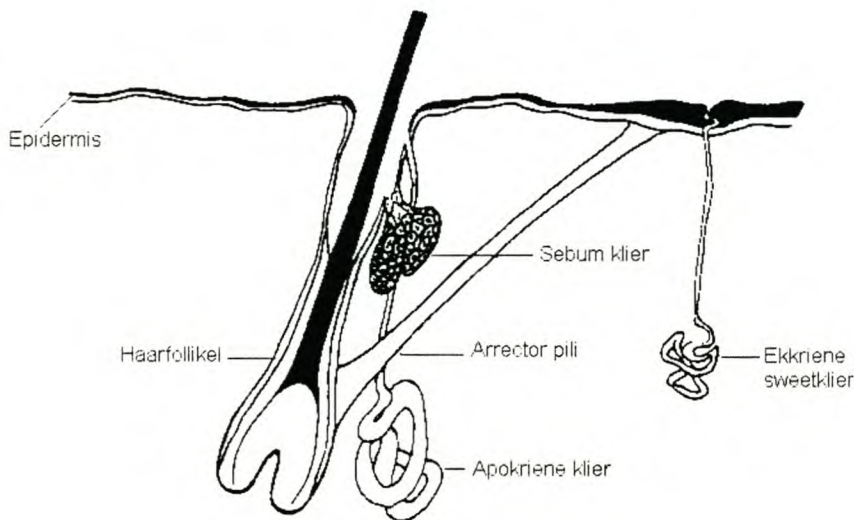


Fig. 1.1: Voorstelling van velstruktuur en velkliere²⁸.

'n Dier se veloppervlak en verskeie kliere, asook ander semiochemiese bronne verskaf 'n habitat wat verskeie mikrobiiese spesies kan huisves. Sakke, buidels, instulpings en voue is vogtig en warm en skep die ideale toestand vir anaerobiese mikrobiiese werking²⁹. Dit gebeur dikwels dat die mikrobiiese spesie tydens sy metaboliese prosesse gebruik maak van die dier se af- of uitscheidings en dié gevolglik na ander produkte omsit. Tydens hierdie proses kan semiochemikalieë geproduseer word. In

die anale sakke van die rooijakkals, *Vulpes vulpes*^{29,30} en Indiese meerkat, *Herpestes auropunctatus*³¹, is duidelike tekens van mikrobiëse aktiwiteit gevind²⁹. Mikrobes speel ook 'n rol in die produksie van die semiochemiese verbindings wat in vaginale en orale afskeidings voorkom.

Urine is 'n belangrike kommunikasiemedium by soogdiere^{14,32} en honderde vlugtig en nie-vlugtige komponente is reeds in die urine van diere geïdentifiseer. Urine verskaf inligting aan die buitewêreld aangaande die fisiologiese toestand waarin 'n dier verkeer en verskaf die nodige basis vir die ontwikkeling van gespesialiseerde semiochemiese sisteme. By baie spesies urineer die mannetjies van die spesies op hulself om vir mekaar en ook vir die wyfies inligting aangaande hul fisiologiese toestand te gee. Alhoewel feromone wat in urine gevind word verskeie funksies vervul en byvoorbeeld aggressie tussen manlike muis kan ontlok, word dit meestal deur soogdiere vir afbakening van territoriale gebiede gebruik³³.

DIE WAARNEMING VAN SEMIOCHEMIKALIEË

Die waarneming van semiochemikalieë deur lewende organismes geskied deur middel van reseptorselle wat spesiaal vir hierdie funksie aangepas is. Chemoreseptorselle is meestal op meer as een komponent ingestel en, met uitsondering van sekere sensilla op die antennes van die heuningby, reageer alle chemoreseptorselle op 'n reeks komponente wat as die betrokke sel se spektrum van verbindings beskou kan word. (Sensilla is lang, sensoriese haartjies wat aangepas is om reukmolekule effektief uit die lug te filtreer waarna dit verder na die reseptorselle vervoer word deur middel van, onder andere, diffusie^{2,34}). In die spektrum van verbindings waarop die onderskeie reseptorselle reageer, kom normaalweg 'n paar verbindings voor wat 'n maksimale reaksie van die reseptorselle ontlok. Die spesifisiteit van die selle verskil in die sin dat sommige reseptorselle 'n wye spektrum het, terwyl ander 'n nou spektrum dek en dus slegs 'n paar komponente effektief kan waarneem. Gewoonlik word 'n sein gesamentlik deur 'n paar reseptore waargeneem en geïnterpreteer. Insekte het hoogs ontwikkelde antennes met duisende reseptorselle waarmee semiochemikalieë in baie lae konsentrasies waargeneem kan word³⁵⁻³⁷. In 1900 is reeds bewys dat die mannetjie *Promethes* mot reageer op 'n reuk wat afgeskei word deur die wyfie, en nie op visuele of ander seine nie. Daar is ook bewys dat die mannetjies die reuk met behulp van hul antennes waarneem, aangesien die mannetjies waarvan die antennes verwyder is, nie

die wyfies kon opspoor nie. Eksperimente met die sywurmmot het dieselfde resultate gelewer³⁵. Olfaktoriese sensilla en spesiale reukreseptore word aangetref op die antennes van die mannetjie wat die seksferomoon (byvoorbeeld bombykol in die geval van die sywurmmot) wat deur die wyfie geproduseer word, in baie klein hoeveelhede kan waarneem¹⁴. Fig. 1.2 toon die antenna van die mannetjie sywurmmot, *Bombyx mori*. Die olfaktoriese sensoriese haartjies (sensilla) is duidelik sigbaar op die antennes².

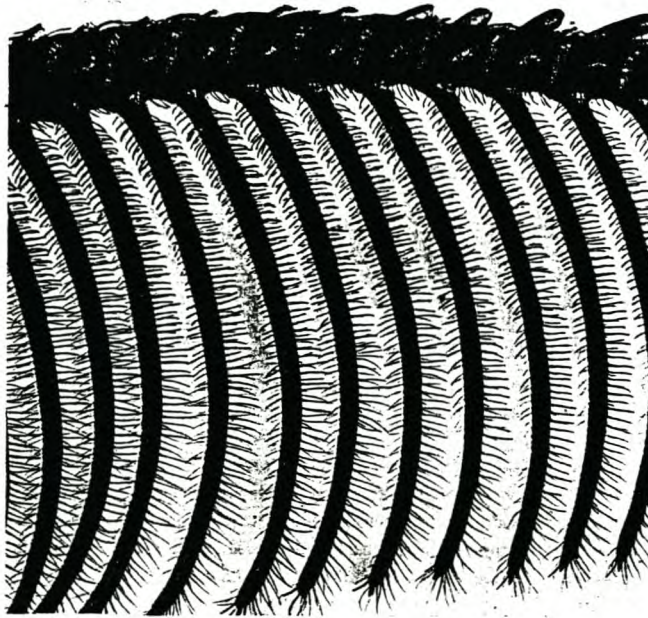


Fig. 1.2: Antennes van die sywurmmot, *Bombyx mori*.

By hoër orde diere is die chemoreseptorsisteme meer gekompliseerd en reseptorelemente bestaan hoofsaaklik uit gespesialiseerde selle waarmee die organisme tussen 'n groot aantal chemikalieë kan onderskei. Reukwaarneming is weereens die resultaat van 'n sel-ensemble waarin individuele reseptore oor veelvuldige en oorvleuelende waarnemingsvermoëns beskik^{34,38}. Die waarnemingsvermoë van hierdie selle verskil na gelang van die graad van ontwikkeling van die organisme en kompleksiteit van die prikkel wat waargeneem moet word. Waar insekte slegs kennis van 'n sekere paar chemikalieë in hul omgewing nodig het vir oorlewing en voortplanting, reageer soogdiere op 'n wyer verskeidenheid van chemiese stimuli in hul omgewing.

Diere kan individue van mekaar onderskei deur middel van reuk. Dit is dus nie verbasend nie dat sosiale kontak meestal bestaan uit die wedersydse besnuffeling van dele van mekaar se liggame, veral dié dele waar daar gespesialiseerde velkliere voorkom. Weens die rol wat die sosiale struktuur van organismes in hulle oorlewing speel en die oorkoepelende teenwoordigheid van chemosensoriese kommunikasie binne die diereryk, is dit nie verrassend dat olfaksie 'n onvervangbare rol speel in interspesifieke sensoriese kommunikasie nie³.

By soogdiere is daar twee sisteme wat verantwoordelik is vir die waarneming van semiochemikalieë, naamlik die olfaktoriese sisteem, wat grootliks betrokke is by waarneming van vlugtiger verbindings en die vomeronasale orgaan wat vir die waarneming van minder vlugtige verbindings aangewend word.

Die Olfaktoriese Sisteem

Olfaksie is 'n oeroue, gesofistikeerde, filogenetiese meganisme van waarneming en differensiasie deur middel van molekulêre patrone in die feromoonsisteem³⁹. Die sintuig van olfaksie vind sy oorsprong in 'n komplekse samestelling van nasale chemoreseptore in die olfaktoriese mukus, harsingsenuwees, primêre sensoriese kerne, en die hoof olfaktoriese lobbe (in die voorbrein) en hul sentrale konneksies⁴⁰. Fig. 1.3 toon 'n vereenvoudigde voorstelling van die basiese olfaktoriese epiteel⁴¹. Drie tipes essensiële selle, naamlik ontvanger-/reseptor- (r), ondersteunende (s) en basale (b) selle, word hier gevind. Fig. 1.4 toon die veralgemeende voorstelling van 'n senuweesel.

Die reseptorselle (r) kom voor in die olfaktoriese epiteel in die nasale holte en is bipolêre neurone, met dendriete (oordragselemente), wat in kontak is met die mukus (m) aan die een kant. Die silia (c) op die eindpunte van die senuweeselle vergroot die sensoriese oppervlakte. 'n Akson (geleidende element) (a) maak die ander deel van die reseptor uit. Dit gelei senuweepulse na die olfaktoriese lob, waar die eerste sinaps plaasvind. Die olfaktoriese epiteel binne elke neusgat kommunikeer met sy eie helfte van die olfaktoriese lob⁴².

Die ondersteunende selle (s) is groter, maar verwant in struktuur aan die reseptore (r). Ondersteunende selle beslaan die grootste volume van die olfaktoriese epiteel. Hulle verrig heel moontlik 'n uitscheidingsfunksie^{41,42}.

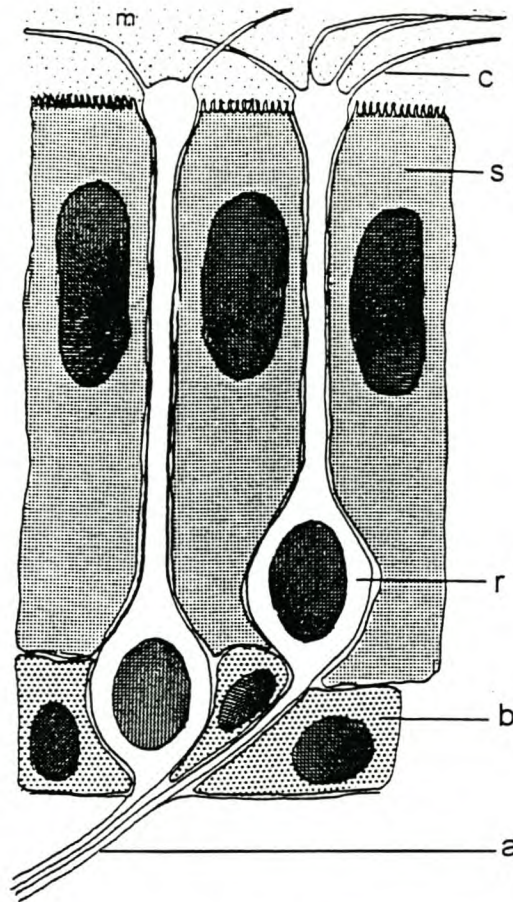


Fig. 1.3: Olfaktoriese epiteel.

Die basale selle (b) is die diepste selle en rus op die *lamina propria*. Binne die lamina word Bowman se kliere gevind. Hierdie kliere se geleibuisse bereik die olfaktoriese oppervlak, waar die gepigmenteerde afskeidings van die Bowmankliere uitgeskei word. Hierdie pigmente is waarskynlik verantwoordelik vir die geel-bruin kleur van die olfaktoriese epiteel in diere⁴¹.

In die olfaktoriese lob vorm die aksons van die primêre reseptorselle die buitenste laag. Hieronder lê die glomeruli. 'n Glomerulus is 'n sferiese omgewing waarin die aksons (ongeveer 25 000) kontak maak met mitrale selle (ongeveer 25). Elke primêre sel kan kontak maak met meer as een sekondêre sel en gevolglik kry elke sekondêre sel inligting van duisende primêre selle.

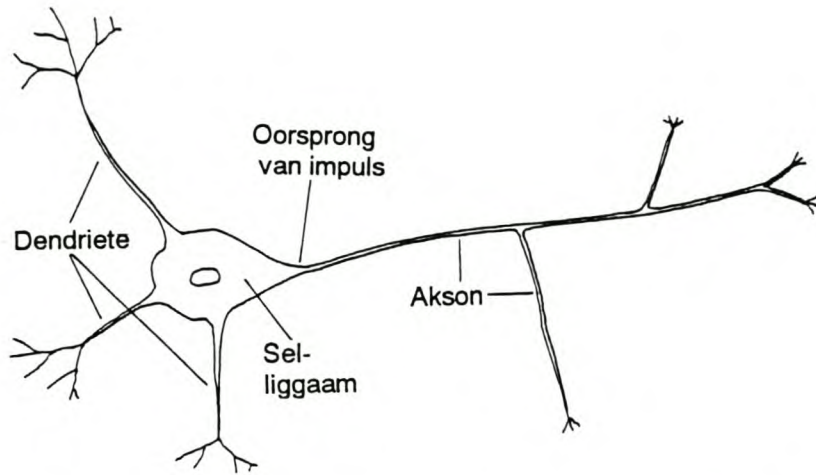


Fig. 1.4: Die veralgemeende voorstelling van 'n senuweesel⁴².

Die aksons van die mitrale selle verlaat die olfaktoriese lob deur die laterale olfaktoriese streek. Periglomerulêre selle dra informasie 'horisontaal' by die vlak van die glomeruli terwyl die kort aksonselle hierdie funksie in die granulêre laag verrig. Daar is ook senuwees wat informasie van die brein aan die olfaktoriese lob kan oordra⁴².

Neurone in die sentrale senuweestelsel kan onderskei tussen natuurlike reuke wat die dier se gedrag en endokriene afskeiding beïnvloed terwyl hormone (wat die gevolg is van endokriene afskeiding) weer die neurone stimuleer om verdere aksies of prosesse te inisieer¹. Die komplekse sensoriese gedrag en fisiologiese gebeure waaruit die kommunikasie proses bestaan moet te alle tye in gedagte gehou word³.

Ander sensoriese sisteme wat nie met die olfaktoriese sisteem verwar moet word nie, is die trigeminale sisteem, die smaakorgane en die vomeronasale orgaan.

Om 'n goeie trigeminale stimulant te wees moet 'n stof chemies aggressief wees of in 'n baie hoë konsentrasie teenwoordig wees. Dit is dus hoogs onwaarskynlik dat trigeminale waarneming betrokke is by 'n semiochemiese sisteem.

Wat smaak betref word die sensoriese organe, of smaakknoppies hoofsaaklik op die tong aangetref, maar kom ook voor in die verhemelte, die farinks en die larinks. Elke smaakknoppie word deur verskeie senuwees bedien. Elke senuwee is egter nie net

met een smaakknoppie verbind nie, maar met 'n area waarin verskeie smaakknoppies voorkom⁴².

Bogenoemde twee sensoriese meganismes is egter van minder belang as die bydrae van die olfaktoriese sisteem en die vomeronasale orgaan. Laasgenoemde orgaan is veral betrokke by waarneming van nie-vlugtige semiochemikalieë.

Aanvanklik is geglo dat nasale chemo-ontvangs verskil van orale chemo-ontvangs in die sin dat eersgenoemde uitsluitlik vlugtige stowwe benodig vir stimulasie. Vlugtige stowwe speel wel 'n baie belangrike rol in semiochemie, maar dit het egter duidelik geword dat nie-vlugtige stowwe 'n groot bron van semiochemikalieë is en dat dit deur die vomeronasale orgaan in die mondholte waargeneem word^{3,43}.

Die feit dat vlugtigheid nie 'n vereiste is vir semiochemiese verbindings nie blyk duidelik uit die feit dat daar wel dikwels fisieke kontak tussen diere en die bron van die sein (baie keer 'n ander dier) is. Diere wat mekaar lek is 'n algemene verskynsel; swartstertherte ruik en lek byvoorbeeld mekaar se tarsale reuk-organe⁴⁴ en die goue hamster mannetjie lek aan die wyfie se vaginale afskeiding⁴⁵. Hierdie is maar twee van vele voorbeelde. Deur die bron te lek kan die dier die betrokke chemikalieë identifiseer deur middel van smaak en olfaksie (reuk), asook *via* die aparte senuweebaar wat deur chemoreseptore van die vomeronasale orgaan verskaf word⁴³.

Indien aanvaar word dat die hoof-olfaktoriese sisteem hoofsaaklik reageer op vlugtige stowwe, impliseer dit dat vlugtige- en nie-vlugtige semiochemikalieë moontlik verskillende funksies verrig deur die olfaktoriese en vomeronasale sisteme onderskeidelik op verskillende maniere te stimuleer³.

Die Vomeronasale Orgaan

Baie diere besit 'n addisionele chemiese sensoriese sisteem, naamlik die vomeronasale- of Jacobson se orgaan waarvan hierbo reeds melding gemaak is. Anatomies verskil die vomeronasale sisteem van die olfaktoriese sisteem in die sin dat hulle na verskillende dele van die sentrale brein projekteer³. Die strukturele detail van die vomeronasale orgaan verskil van spesie tot spesie.

Die vomeronasale orgaan word aangetref in meeste landdiere en kom voor as 'n stompeindigende sak wat uitmond in die vloer van die nasale holte in die harde verhemelte. Die selle wat Jacobson se orgaan uitvoer, is soortgelyk aan dié van die olfaktoriese reseptorselle, behalwe dat hier mikrovilli is in plaas van silia (sensoriese haartjies). Soos by olfaktoriese selle en smaakselle word hierdie selle gedurig vervang⁴². Die vomeronasale sisteem bestaan uit reseptore in die vomeronasale orgaan wat projekteer *via* die vomeronasale senuwee na die bykomende olfaktoriese lobbe in die sentrale senuweestelsel⁴⁶ en kan dus as 'n aparte sensoriese sisteem beskou word wat nie deur aksone van die hoofdeel van die olfaktoriese lob bereik word nie. Blykbaar oorvleuel sentrale projeksies van die bykomende olfaktoriese lobbe nie met die van die olfaktoriese lobbe nie, dus is die primêre olfaktoriese sisteem en die vomeronasale sisteem anatomies onafhanklik van mekaar⁴⁰. Die vomeronasale orgaan kan as 'n algemene sensoriese orgaan beskou word eerder as 'n gespesialiseerde ontvanger van spesifieke semio-chemikalieë. Dit sal reageer op gasagtige geure, maar daar word geglo dat die hoof funksie daarvan is om materiale in oplossing waar te neem. Waarneming met behulp van die vomeronasale orgaan geskied gewoonlik na fisiese kontak, gewoonlik mondkontak, met 'n semiochemiese bron. Die Asiese olifant dra byvoorbeeld chemiese informasie van sy maat oor na sy eie bek, deur die punt van sy slurp te gebruik⁴⁷.

Na mondkontak met 'n semiochemiese bron reageer 'n wye verskeidenheid van diere gewoonlik met 'n stereotipe grinnik of sogenaamde 'flehmen' reaksie (wat die opkrul van die bolip, toemaak van neusgate, diep asemhaling en moontlik ook beweging van die kop behels) wat geassosieer word met die vomeronasale orgaan^{43,46,48,49}. 'n Skematiese voorstelling van 'flehmen' by die swartwitpens, *Hippotragus niger*, (Fig. 1.5) wat as reaksie op die waarneming van die urine van die ooi volg, toon duidelik die werking van die vomeronasale orgaan. Die epiglottis (E) en die neusgate is gesluit en lug word deur kort buise (ID) in die harde verhemelte na die vomeronasale orgaan (VO) ingesui⁴⁸.

Die funksie van 'flehmen' is waarskynlik om die vomeronasale orgaan te stimuleer en afhangend van die inligting wat ontvang is, kan verskillende post-flehmen gedragspatrone verwag word. Gedurende estrum, veral net voor ovulasie, word 'n feromoon in die Asiatiese olifant, *Elephas maximus*, se urine vrygestel. Hierdie

feromoon, wat met behulp van KMR en GC-MS geïdentifiseer is as (Z)-7-dodeken-1-ielasetaat, ontlok verskeie tipes chemo-sensoriese reaksies by die olifantbul, waarvan een die flehmen-reaksie is wat in hierdie geval paring voorafgaan⁵⁰. Tydens flehmen word vloeistowwe, wat die reaksie ontlok, met behulp van die punt van die slurp na die openinge in die harde verhemelte, wat na die vomeronasale orgaan lei, geneem^{22,51}. In die meeste gevalle word opgeloste materiaal wat deur die mond ingeneem word na die orgaan beweeg deur middel van die tong en 'n pomp-aksie van die orgaan self⁴³.

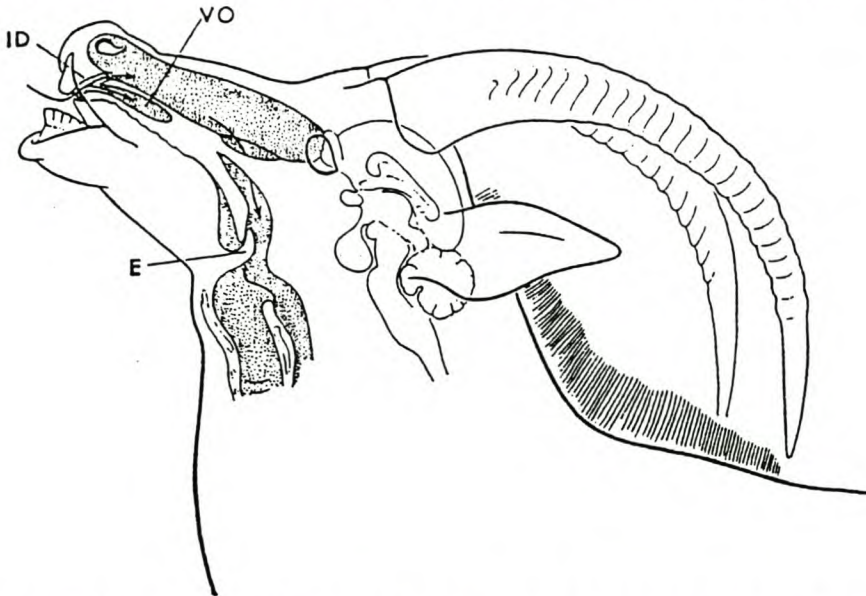


Fig. 1.5: Skematiese voorstelling van 'flehmen' by die swartwitpens, *Hippotragus niger*⁴⁸.

ARTIODACTYLA

Chemiese seine speel 'n belangrike rol in die lewe van hoefdiere van die orde Artiodactyla en Perissodactyla. Artiodactyla is diere met ewe aantal tone – óf 'n gesplete hoof met twee tone, óf 'n gespreide voet met vier tone. Ongeveer 210 spesies, wat varke, seekoeie, takbokke, kamele, kameelperde, bokke en skape insluit, behoort tot hierdie orde^{52,53}.

Semiochemiese bronne by die Artiodactyla sluit urine, faeces en 'n groot aantal gespesialiseerde velklierafscheidings in. Die verskillende kliere sluit onder andere preorbitale, interdigitale, kaudale (stertklier), metatarsale en tarsale kliere in⁵⁴. Die basiese ligging van hierdie kliere word in Fig. 1.6 aangedui⁵⁵.

Die struktuur van die kliere is 'n gespesialiseerde vorm van die basiese velstruktuur waarvan die graad van spesialisasie varieer van geval tot geval. Kliere met net effens meer as die gewone konsentrasie vet- en/of apokrine kliere, tot strukture met meer komplekse anatomiese karakter word gevind. Hierdie kliere kom verspreid voor op die liggaamsoppervlak van die meeste dierspesies en die semiochemikalieë wat afgeskei word, sluit gewoonlik die volgende tipes verbindings in: langketting vetsure en verwante stowwe, terpenoïede wat afgelei is van die intermediêre verbindings op die biosintetiese roete na cholesterol, sterole en stowwe wat ontstaan as gevolg van mikrobiële aksie⁵⁴.

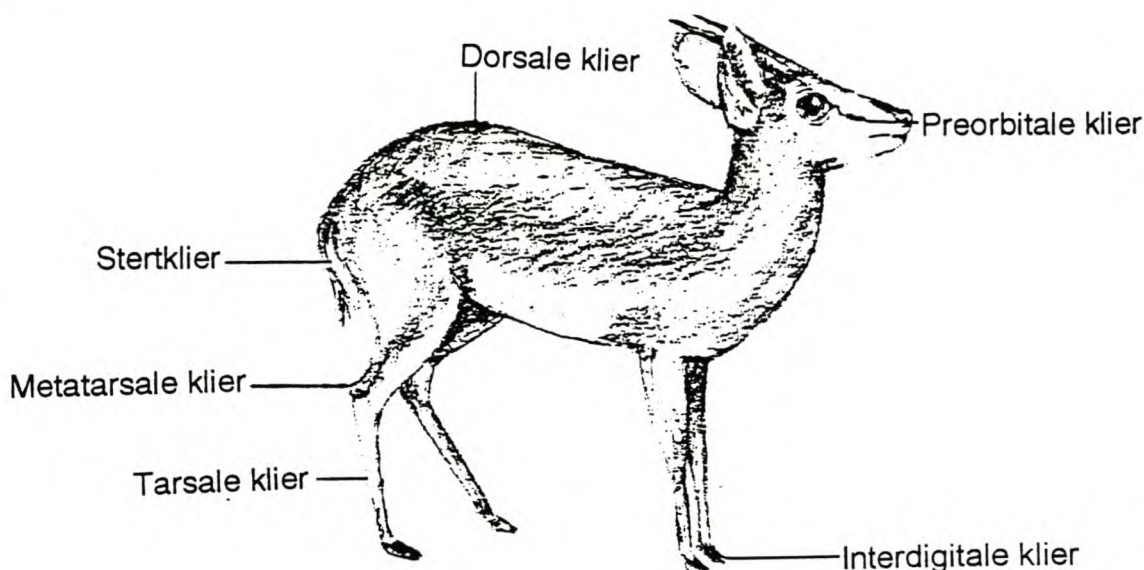
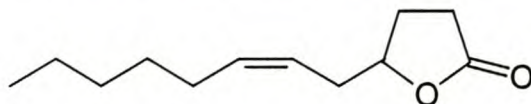


Fig. 1.6: Basiese ligging van verskillende velkliere by Artiodactyla.

In die swartsterthert, *Odocoileus hemionus columbianus*, is vier belangrike kommunikasieverwante kliere gevind. Die tarsale reuk speel 'n belangrike rol in wedersydse herkenning en die hoofkomponent daarvan is as (Z)-4-hidroksidodek-6-enoësuurlaktoon of (Z)-6-dodeken-4-olied geïdentifiseer^{54,56}. Dit het ook geblyk dat die



(Z)-6-dodeken-4-olied

bokke tussen die geometriese isomere van die verbinding kan onderskei en meer reaksie toon op die *cis*-isomeer as die *trans*-isomeer⁵⁷. Die metatarsale reuk tree op as

alarmferomoon terwyl die preorbitale klier gebruik word vir territoriale afbakening. Die funksie van urine is om die omgewing te merk en ander individue te lok of af te skrik, afhangend van omstandighede⁵⁶. Die urine van hierdie spesie kan oorgedra word óf deur direkte urinering in die omgewing, óf deur 'n gedragspatroon wat bekend staan as vryf-urinering waar die bok sy hakke in die omgewing van die tarsale klier teen mekaar vryf terwyl hy daarop urineer^{54,56}.

Die afskeiding van die onderskeie kliere bly nie suiwer nie weens verskeie gedragspatrone wat verseker dat afskeidings van verskeie kliere meng. By die takbok, *Rangifer tarandus*, meng die afskeiding van die kaudale klier van die wyfie waarskynlik met urine en vaginale afskeidings, terwyl die interdigitale kliere by die ram met urine benat word sodat die interdigitale kliere sterk na urine ruik. Urine kan ook van dier na dier oorgedra word tydens 'n konfrontasie. 'n Ander gedragspatroon is die sogenaamde agterbeen-kop-kontak waarby die takbok sy kop of sy horings teen die interdigitale area van sy agterbeen vryf⁵⁸.

Preorbitale afskeidings van verskeie bokspesies

Preorbitale kliere kom in pare voor en word reg voor die oog van verskeie antelooopsesies gevind. Die klierstruktuur verskil van spesie tot spesie en wissel van 'n groefvormige verlenging van die binneste hoek van die oog tot 'n diep holte apart van die oog⁵⁹. Die preorbitale klierafskeidings van verskeie antelooopsesies is deur die Laboratorium vir Ekologiese Chemie gekarakteriseer en die tipes verbindings met mekaar vergelyk. Die spesies wat ondersoek is, is almal territoriale diere en die preorbitale klierafskeiding word soms deur slegs die ram en in sommige gevalle, soos by die blouduiker, ook deur die ooi, vir territoriale afbakening gebruik.

Die rooi- en zebraduiker behoort tot dieselfde genus, *Cephalophus*, terwyl die grysdruiker tot die genus *Sylvicapra* en die blouduiker tot die genus *Philantomba* behoort. Volgens die taksonomie van hierdie diere sou verwag word dat die chemiese samestelling van die preorbitale afskeidings van die rooi- en zebradruikers tot 'n mate sou ooreenstem en van dié van die grysdruiker verskil. Met die identifikasie van die komponente van die preorbitale kliere van bogenoemde vier spesies is, soos verwag, gevind dat die samestelling van die preorbitale afskeidings van die rooi- en zebradruikers kwalitatief goed ooreenstem en hoofsaaklik langketting onvertakte

verbindings bevat, terwyl die preorbitale afskeiding van die blouduiker veral kort-ketting vertakte verbindings bevat. Die aanvanklike foutiewe klassifikasie van die blouduiker as lid van die *Cephalophus*-genus, sou deur bogenoemd feit bevraagteken kon word, veral ook aangesien die preorbitale afskeiding van die rooiduiker beter ooreenstem met dié van die gryssduiker as met dié van die blouduiker⁶⁰. Die herbenaming van die blouduiker as *Philantomba monicola* het egter hierdie teenstrydigheid uit die weg geruim⁶¹⁻⁶³.

Buiten die karakterisering van die preorbitale klierafscheidings van die duikers is die preorbitale afscheidings van verskeie ander anteloopspesies ondersoek. Lede van die subfamilie Antilopinae, wat ook bekend staan as die dwerg-anteloopspesies, varieer aansienlik in voorkoms en habitat. Die dwerganteloop, *Neotragus batesi*, kom voor in die digte bosse van sentrale Afrika, terwyl die oribi, *Orebia ourebi*, op oop grasvlaktes naby water gevind word. Die klipspringer, *Oreotragus oreotragus*, daarenteen verkies bergagtige omgewings en die dik-dik, *Madoqua kirkii*, kom in die droë bosveld voor. Die enigste ooreenkoms tussen lede van hierdie spesie is hul grootte en goed ontwikkelde eksokriene kliere, veral hul preorbitale kliere wat hoofsaaklik gebruik word vir territoriale afbakening. Die preorbitale klierafskieding van die klipspringer, *Oreotragus oreotragus*, bevat slegs agt komponente in teenstelling met die afscheidings van ander lede van hierdie groep waarvan die afscheidings honderde verbindings bevat.

Die klipspringer is 'n klein bokkie van 8-18 kg met 'n gemiddelde hoogte van 43-51 cm wat in klipperige areas soos berge en kranse voorkom en tot op 'n hoogte van 4000 m bo seespieël gevind kan word. Klipspringers is territoriale diere en gebruik hoofsaaklik mishopies en afscheidings van verskeie reukkliere, veral die preorbitale klier, om hul gebied af te baken⁶⁴. In beide geslagte van die klipspringer is die preorbitale klier 'n groterige spleet net voor die voorste hoek van die oog waarin verhoringde epidermale selle van die kante van die klier, afscheidings van die oogholte, en partikels van die omgewing versamel⁶⁴. Die preorbitale klier is prominent in die ram sowel as die ooi en word deur beide diere vir territoriale afbakening gebruik, alhoewel die mannetjie gewoonlik bo-oor die wyfie se merk merk. 'n Interessante verskynsel is dat die volwasse bosluis, *Ixodes matopi*, deur die water-oplosbare fraksie van die afskeiding aangetrek word en op die afscheidingsmerk versamel om dan hul gasheer, die klipspringer, op te spoor wanneer dit weer aan die merk kom ruik of lek soos die

gewoonte is. Hierdie is nog 'n voorbeeld van 'n feromoon wat deur 'n ander spesie as kaïromoon gebruik word. Die preorbitale afskeiding van die klipspringer is uniek in terme van die preorbitale afskeidings van die lede van die stam Antelopini, deurdat dit bestaan uit 'n soliede massa wat onder andere vyf nie-vlugtige proteïene bevat, waarvan sommige optree as draermateriaal vir die gekontroleerde vrystelling van die vlugtige komponente in die afskeiding. Agt verbindings, naamlik die ketone 3-pentanoon, 4-metiel-2-pentanoon, 5-metiel-3-heksanoon, 4-metiel-3-heksanoon en die esters etielpropanoaat, 2-metielpropielasetaat, etiel-3-metielbutanoaat en isobutielpropanoaat is as vlugtige komponente in die preorbitale afskeiding van die klipspringer geïdentifiseer^{65,66}.

In teenstelling met die preorbitale afskeiding van die klipspringer, bevat die preorbitale afskeiding van die grysbok, *Raphicerus melanotis*, 'n baie klein persentasie nie-vlugtige komponente en is die samestelling van die vlugtige komponente daarin baie meer kompleks. Die Kaapse grysbok, *Raphicerus melanotis*, is 'n klein bruin, gespikkelde bokkie van ongeveer 10 kg met 'n skouerhoogte van ongeveer 54 cm. Die grysbok behoort tot die orde Artiodactyla, die familie Bovidae en die subfamilie Antelopini. Slegs die ramme het kort, gladde horings wat effens agtertoe lê. Die grysbok kom voor in die digte bosse van die Kaapprovinsie en kommunikeer daarom hoofsaaklik op olfaktoriese wyse. Grysbokke is alleenlopers en hoofsaaklik in die nag aktief. Beide die ram en die ooi besit 'n paar preorbitale kliere waarvan die opening ongeveer 1 cm voor elke oog geleë is. Die preorbitale klier is omtrent 0.5 cm in deursnee, effens dieper (0.6 tot 0.7 cm) by die ram as die ooi (0.5 cm) en word omring deur 'n area van kort haartjies. Dit lewer 'n taai swart afskeiding wat gebruik word vir territoriale afbakening en wat willekeurig afgeskei kan word as gevolg van gestreepte spierbondels wat kruis en dwars deur die klier voorkom⁵⁹. Die preorbitale klierafskeding is kwalitatief en kwantitatief soortgelyk, alhoewel vergelyking van sekere komponente tussen die ram en ooi kwantitatief kan verskil. Aanvanklik is 27 van die vlugtige komponente in die preorbitale afskeiding van die grysbok geïdentifiseer en dit sluit hoofsaaklik 'n groot aantal vlugtige reguitketting versadigde en onversadigde alkohole, formiate en karboksielsure in⁶⁷⁻⁶⁹. Meer effektiewe kapillêre kolomme en nuwe metodes vir die bepaling van die posisie van dubbelbindings in langketting onversadigde verbindings, het die identifikasie van 'n verdere 51 komponente moontlik gemaak⁷⁰. In teenstelling met die preorbitale afskeiding van die oribi, waar die komponente 'n beperkte

kettinglengte het, het dit geblyk dat die preorbitale afskeiding van die grysbok addisionele komponente bevat waarvan die kettinglengtes langer is as wat reeds in die preorbitale afskeiding van die grysbok geïdentifiseer is⁷¹. Hierdie komponente het lae dampdrukke en aangesien die grysbok gereeld merk, is dit onwaarskynlik dat hierdie langketting komponente aktief deel is van die territoriale afbakening-feromoon, maar eerder optree as draermateriaal vir die gekontroleerde vrystelling van die vlugtiger komponente van die preorbitale afskeiding. Laasgenoemde komponente sluit van die volgende tipes verbindings in: versadigde en onversadigde aldehyede, γ - en δ -laktone, alkielmetielsulfiede, β -hidroksi-alkielasetate en 15 versadigde, 18 mono-onversadigde en 5 dubbel-onversadigde formiate. Verder is verskeie primêre alkohole (versadig, mono- en dubbel-onversadig) geïdentifiseer. Die Z-konfigurasie is aan alle dubbelbindings van die onderskeie natuurlike onversadigde verbindingstipes toegeken op grond van hul ^{13}C -KMR-spektra wat tydens 'n vorige studie⁷⁰ van die geïsoleerde produkte opgeneem is. Die teenwoordigheid van 'n piek met 'n resonansie van ongeveer 27.2 dpm, kan naamlik by alliliese koolstofatome as duidelike bewys dien dat die dubbelbindings in hierdie komponente Z-konfigurasie besit. 'n Resonansie by 32.5 dpm word vir 'n alliliese koolstofatoom met E-konfigurasie verwag^{72,73}. In die identifikasie van bogenoemde verbindings is verskeie analitiese- en preparatiewe metodes gebruik en aangesien gc-ms in baie gevalle onvoldoende was om komponente akkuraat te bepaal, is onder andere van preparatiewe gaschromatografie gebruik gemaak, waarna verskeie verbindings met behulp van KMR ondersoek is. Onversadigde komponente is aan osonolise onderwerp om die posisie van dubbelbindings te bepaal⁷⁰. In 'n latere studie is ook van dimetioldisulfiedderivatisering gebruik gemaak vir die bepaling van dubbelbindingposisies^{59,70,74-76}.

In 'n meer onlangse studie⁷⁷ is die preorbitale afskeiding van die steenbok, *Raphicerus campestris*, geïdentifiseer en die chemiese samestelling daarvan vergelyk met dié van die grysbok. Dit het geblyk dat die afskeidings baie soortgelyk is wat die tipe verbindings betref, maar slegs 22 van die geïdentifiseerde komponente is in beide afskeidings teenwoordig. Dit is maar 'n klein persentasie van die 260 komponente waaruit die preorbitale afskeiding van die steenbok (selfs meer kompleks is as dié van die grysbok) bestaan⁷⁷.

DOELSTELLING

As gevolg van die beskadiging van landerye, boorde, plantasies en wingerde deur verskeie klein antelooptspesies, veral die grysbok, is 'n navorsingsprojek begin om die moontlike beheer van hierdie diere met behulp van spesie-spesifieke sintetiese feromone te ondersoek. Indien die komponente wat vir territoriale afbakening gebruik word, geïsoleer en geïdentifiseer kan word, sou die aktiewe komponente of soortgelyke verbindings moontlik gesintetiseer en gebruik kon word om die diere te beheer en hulle byvoorbeeld uit wingerde, boorde, landerye en plantasies te hou²⁰. Probleme is ondervind met die biologiese evaluering van die komponente van die preorbitale afskeiding van die grysbok en meer kennis aangaande die chemiese ekologie van hierdie tipe diere is dus nodig voor verdere pogings tot biologiese evaluering of die beheer van probleemdiere aangewend kan word. Dit kan onder andere bereik word deur die samestelling van afskeidings van naverwante diere te vergelyk⁷⁸. Aangesien die preorbitale klier by die meeste van hierdie spesies 'n belangrike rol in territoriale afbakening speel, is die karakterisering van die preorbitale klierafskedings dus essensieel in hierdie navorsingsprogram en is die preorbitale klierafskedings van verskeie antelooptspesies reeds deur die Laboratorium vir Ekologiese Chemie ondersoek^{66,70,71,74,77,79, 80}.

In 'n vorige studie⁸² is die preorbitale afskeiding van die suni, *Neotragus moschatus*, ook ondersoek. Tydens hierdie ondersoek is die vlugtige verbindings in die preorbitale afskeiding van die ram redelik volledig gekarakteriseer en 83 verbindings geïdentifiseer. Homoloë reekse van alkane, 2-metielalkane, alkene, aldehiede, karboksielsure, alk-1-ielformiate en alken-1-ielformiate kom voor, terwyl bensoësuur en cholesterol ook daarin gevind is⁸². In die betrokke studie⁸² is getoon dat die preorbitale afskeidings van die ram en die ooi aansienlik verskil. Vergelyking van gaschromatogramme van die onderskeie afskeidings wat onder soortgelyke omstandighede opgeneem is, toon duidelike verskille in kwantiteit en samestelling. Die verskil kan waarskynlik toegeskryf word aan die feit dat die preorbitale afskeiding by die suni onder andere gebruik word vir territoriale afbakening van gebiede en dat die ram hoofsaaklik hiervoor verantwoordelik is. GC-MS-analise van 'n ekstrak van die preorbitale afskeiding van die suni-ooi toon dat daar drie hoofkomponente en verskeie ondergeskikte komponente in hierdie afskeiding voorkom. 'n Vorige poging om die

preorbitale afskeiding van die suni-ooi te karakteriseer het egter getoon dat GC en GC-MS nie genoeg inligting verskaf om twee van die hoofkomponente te identifiseer nie. Slegs 'n paar van die ondergeskikte komponente en een van die hoofkomponente (cholesterol) is tentatief geïdentifiseer⁸².

Met hierdie projek word beoog om die preorbitale afskeiding van die suni-ooi volledig te ondersoek, die twee onbekende hoofkomponente, met 'n basispiek by m/z 153 te identifiseer en van die ander vlugtige komponente in die afskeiding so volledig as moontlik te karakteriseer. Verdere analitiese metodes soos byvoorbeeld KMR en GC-IR kan aangewend word om hierdie doel te bereik.

Verwysings: Hoofstuk 1

1. Doty, R. L., "Mammalian Olfaction, Reproductive Processes and Behaviour", Academic Press, London (1976), p57-58.
2. Schneider, D., "Gustation and Olfaction", Ohloff, G. & Thomas, A. F. (Eds.), Academic Press, London (1971), p45-47.
3. Doty, R. L., *Experientia* **42**, p257-269 (1986).
4. Albone, E. S., "Mammalian Semiochemistry. The Investigation of Chemical Signals between Mammals", Wiley & Sons, New York (1984), p1-5.
5. Morgan, E. D., *Chemistry & Industry*, 370-373 (1994).
6. Eberhard, W. G., *Science* **198**, 1173-1175 (1977)
7. Verwysing 1, p144-145.
8. Nell, A. E., "Identifisering en Kwantifisering van Biologies Aktiewe Komponente van die Eksokriene Afskeiding van *Eldana Saccharina*", M.Sc-skripsie, Universiteit van Stellenbosch (1988), p3.
9. Birch, M. C., en Haynes, K. F., "Insect Pheromones", Studies in Biology no. 147, Edward Arnold, London (1982), p1-5, 21-24.
10. Wilson, E. O. en Bossert, W. H., *Rec. Progr. Hormone Res.* **19**, 673-716 (1963) – Verwysing uit "Insect Behaviour", J.R. Matthews en R.W. Matthews, John Wiley & Sons, New York (1978), p187-189.
11. Müller-Schwarze, D., "Chemical Signals In Vertebrates", Müller-Schwarze, D. en Mozell, M. M. (Red.), Plenum Press, New York (1976), p420-421.

12. Bullock, T.H., "The Neurosciences", Schmitt, F. O. & Worden, F. G. (Eds.), The MIT Press, Cambridge (1974), p343-346.
13. Verwysing 1, p122-124.
14. Verwysing 1, p148-149.
15. Butenandt, A., Hecker, E., Hopp, M., en Koch, W., *Liebigs Annalen der Chemie* **658**, 39-64 (1959).
16. Matsuyama, S., Suzuki, T. en Sasagawa, H., "Chemical Ecology in the Japanese Honeybee, *Apis cerana japonica* rad.: Comparison of Worker Pheromones with those of *A. mellifera* L.", *ISCE*, <http://www.isce.ucr.edu/meetings/97/C-6-2.html>, 7 November 2000.
17. Schmidt, O., Morgan, E. D., Oldham, N. J., Do nascimento, R. R. en Dani, F. R., "Pheromone Components in the Venom of Asian Honey Bees", *ISCE*, <http://www.isce.ucr.edu/meetings/97/C-6-5.html>, 7 November 2000.
18. Burger, B. V., Peterson, W. G. B. en Munro, A. M., "Semiochemicals of Dung Beetles of the Genus *Kheper*", *ISCE*, <http://www.isce.ucr.edu/meetings/97/C-1-10.html>, 29 Mei 1998.
19. Verwysing 8, p93.
20. Ruppel, A., "Microorganisms of the Preorbital Glands of the Cape Grysbok, *Raphicerus Melanotis* Thunberg", M.Sc-skripsie, Universiteit van Stellenbosch (1984), p3.
21. Burger, B. V., le Roux, M., Garbers, C. F. en Spies, H. S. C., *Z. Naturforsch.* **31c**, 21-28 (1976).
22. Rasmussen, L.E.L., Lee, T.D., Zhuang, A., Roelofs, W.L. en Daves, G.D.(Jr), *Chemical Senses* **22**, 417-437 (1997).

23. Verwysing 1, p152-155.
24. Verwysing 11, p416-420.
25. Jacobson, M., "Insect Sex Pheromones", Academic Press, New York (1972), p79-100.
26. Jacobson, M., "Insect Sex Attractants", Interscience Publishers, New York (1965), p52-58.
27. Verwysing 4, p40-50.
28. Adams, M.G., in "Olfaction in Mammals", Stoddart, D.M. (Ed.), Academic Press, New York (1980), p58.
29. Verwysing 4, p135-144.
30. Gosden, P.E. en Ware, G.C., *J. Appl. Bact.* **41**, 271-175 (1976).
31. Gorman *et al.* in Verwysing 4, p135-144.
32. Doty, R. L., *Journal of Comparative and Physiological Psychology* **84**, 296-303 (1973).
33. Verwysing 4, p165.
34. Boeckh, J., "Olfaction and Taste VII", van der Starre, H. (Ed.), IRL Press Ltd., London (1980), p113-122.
35. Verwysing 26, p59-72.
36. Visser, J. H. en Piron, P. G. M., "Responses of Aphids to Plant Odours", *ISCE*, <http://www.isce.ucr.edu/meetings/97/C-4-1.html>, 29 Mei 1998.

37. Roelofs, W.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 44-49 (1995)
38. Moulton, D. G., "Gustation and Olfaction", Ohloff, G. & Thomas, A. F. (Eds.), Academic Press, London (1971), p19-21.
39. Verwysing 2, p56.
40. Verwysing 1, p97.
41. Verwysing 2, p3-12.
42. Verwysing 4, p243-253.
43. Verwysing 4, p13-17.
44. Müller-Schwarze, D., *J. Ultrastructure Res.* **59**, 223-230 (1977).
45. Johnston, R.E., *Behavioral Biology* **12**, 111-117 (1974).
46. Barber, P.C. en Raisman, G., *Brain Research* **81**, 21-30 (1974).
47. Eisenberg, J.F., McKay, G.M. en Jainudeen, M.R., *Behaviour* **38**, 193-225 (1971).
48. Estes, R.D., *Mammalia* **36**, 315-341 (1972).
49. O'Brien, P.H., *Animal Behaviour* **30**, 1015-1019 (1982).
50. Rasmussen *et al.* (1982, 1986, 1993) in Verwysing 22.
51. Rasmussen, L. E. L., Roelofs, W. L., Ahang, A., Lazar, J., Feng, L. en Prestwich, G. D., "Behavioral and Molecular Biological Aspects of (Z)-7-Dodecenyl Acetate as Sex Pheromone in Asian Elephants", *ISCE*, <http://www.isce.ucr.edu/meetings/97/C-3-1.html>, 29 Mei 1998.

52. <http://www.ewt.org.za/>, 29 Mei 1998
53. Stuart, C. en Stuart, T., "Veldgids tot die Soogdiere van Suider-Afrika", Struik Uitgewers, Kaapstad (1988), p6, 25-27.
54. Verwysing 4, p74-79.
55. Stander, M. A., "Chemiese Karakterisering van die Preorbitale Afskeiding van die Suni, *Neotragus Moschatus*", M.Sc-tesis, Universiteit van Stellenbosch (1997), p6.
56. Müller-Schwarze, D., *Animal Behaviour* **19**, 141-152 (1971).
57. Verwysing 11, p424-427.
58. Verwysing 4, p83-85.
59. Le Roux, M., "Chemiese Samestelling van Eksokriene Klierafskeidings van die Bontebok (*Damaliscus dorcas dorcas*), Springbok (*Antidorcas marsupialis*) en Grysbok (*Racipherus melanotis*)", Ph.D.-proefskrif, Universiteit van Stellenbosch (1980), p98-99.
60. Kotzé, H.A., "Identifikasie en Sintese van Spiroasetale van die Preorbitale Afskeiding van die Rooiduiker, *Cephalophus natalensis*", M.Sc-Tesis, Universiteit van Stellenbosch (1996), p18-19.
61. Greyling, J., "Chemiese Karakterisering van die Preorbitale Afskeiding van die Steenbok, *Racipherus campestris*, en die Rooiduiker, *Cephalophus natalensis*", Ph.D.-proefskrif, Universiteit van Stellenbosch (1992), p244-248 & opsomming.
62. Pretorius, P. J., "Identifikasie van die Vlugtige Komponente uit die Preorbitaalklierafskeidings van die Grysduiker, (*Sylvicapra grimmia*) en die

- Blouduiker, (*Cephalopus monticola*)", Ph.D.-proefskrif, Universiteit van Stellenbosch (1987), p123-166, 200.
63. Stander, J., "Die Identifikasie van die Vlugtige Komponente in die Preorbitale Klierafskeiding van die Rooiuidiker, *Cephalopus natalensis*", M.Sc-Tesis, Universiteit van Stellenbosch (1988), p58-193.
64. Norton, P. M., "The Habitat and Feeding Ecology of the Klipspringer, *Oreotragus oreotragus* (Zimmerman, 1783), in two areas of the Cape Province", M.Sc-Tesis, Universiteit van Pretoria, Pretoria (1980), p39-43.
65. Yang, T.-P., "Olfactory Communication: Chemical Characterization of the Preorbital Secretion of the Klipspringer, *Oreotragus oreotragus*", M.Sc-Tesis, Universiteit van Stellenbosch (1995), p32-53 & opsomming.
66. Burger, B.V., Yang, T.-P., Le Roux, M., Brandt, W.F., Cox, A.J. en Hart, P.F., *Journal of Chemical Ecology* **23**(10), 2383-2400 (1997).
67. Bigalke, R. C., Novellie, P. A. en le Roux, M., "Chemical Signals: Vertebrates and Aquatic Invertebrates", Müller-Schwarze, D. en Silverstein, R. M. (Eds.), Plenum, New York (1976), p421-423.
68. Burger, B. V., le Roux, M., en Bigalke, R. C., "Olfaction and Taste VII", van der Starre, H. (Ed.), IRL Press Ltd., London (1980), p91.
69. Burger, B. V., le Roux, M., Spies, H. S. C., Truter, V., Bigalke, R. C., en Novellie, P. A., *Z. Naturforsch.* **36c**, 344-346 (1981).
70. Verwysing 59, p107-123.
71. Mo, W.-P., Burger, B.V., le Roux, M., en Spies, H. S. C., *Journal of Chemical Ecology* **21**(8), 1191-1215 (1995).

72. Breitmaier, E., Haas, G., en Voelter, W., "Atlas of Carbon-13 NMR Data" Vol. 1, Heydon & Son Ltd., London (1979), Compounds 36-105.
73. Wenkert *et al.* in "Mammalian Exocrine Secretions: X. Constituents fo Preorbital secretion of Grysbok, *Raphicerus melanotis*", *Journal of Chemical Ecology* **22**(4), 739-764.
74. Burger, B. V., Tien, F.-C., le Roux, M. en Mo, W.-P., *Journal of Chemical Ecology* **22**(4), 739-764 (1996)
75. Tien, F.-C., "Structure Elucidation of Constituents of the Preorbital Secretion of the Grysbok, *Raphicerus melanotis*", M.Sc-Tesis, Universiteit van Stellenbosch (1993), p44-133.
76. Verwysing 20, p33-38.
77. Burger, B. V., Greyling, J. en Spies, H. S. C., *Journal of Chemical Ecology* **25**(9), 2099-2107 (1999)
78. Verwysing 61, p36.
79. Mo, W.-P., "Olfactory communication: Chemical Communication: Chemical Characterization of the Preorbital Secretion of the Oribi, *Ourebia ourebi*", Ph.D.-proefskrif, Universiteit van Stellenbosch (1994), p22.
80. Verwysing 60, p12-13.
81. Verwysing 61, p23-25.
82. Verwysing 55, p29-82 & opsomming.

HOOFSTUK 2

CHEMIESE KARAKTERISERING VAN DIE PREORBITALE KLIERAFSKEIDING VAN DIE SUNI- OOI, *NEOTRAGUS MOSCHATUS*

Die suni, *Neotragus moschatus* (Fig. 2.1), is 'n een van die kleinste anteloopspecies en het 'n skouerhoogte van ongeveer 35 cm. Die ram het 'n gemiddelde massa van 5.0 kg terwyl die ooie 5.4 kg weeg. Hulle kom hoofsaaklik voor in die oostelike dele van Afrika, veral die Kwazulu-Natalse kusgebied vanaf False Bay Park by St. Lucia-meer, noord tot in die Marsabit-gebied van Kenia. Binne hierdie grense kom hulle voor soos hul habitat, bestaande uit rivierboswêreld, droë ruigtes en digte struikgewasse, dit toelaat. Die suni/soenie se naam is afgelei van die Kikuyu naam vir die spesie, "kasuni", of van die Wachagga-stam van Kenia wat die bokkie "suni" noem.



Figuur 2.1 Die suni-ram¹

Hierdie bokkie behoort, soos onder andere die oribi, *Ourebia ourebi*, die steenbok, *Raphicerus campestris* en die klipspringer, *Oreotragus oreotragus*, tot die orde Artiodactyla, die familie Bovidae, subfamilie Antilopinae en die stam Neotragini.

Die klein roesbruin lyfie van die suni het 'n gespikkelde voorkoms as gevolg van ligter haartjies op sy donkerder lyf. Die kop en voorkop is effens donkerder as die rug, met ore wat breed en gerond is by die punte met omtrent geen hare aan die binnekant nie.

Die pens en dun, slanke bene is ligter as die bolyf met 'n dun, donker band net bokant elke hoof. Die stert is langerig, donkerbruin bo, wit onder en word gedurig heen-en-weer gepiets. Slegs die ram het kort, reguit, wydgespasieerde horings wat agtertoe lê in dieselfde vlak as die gesig. Suni's kom voor in pare of familiegroepe wat bestaan uit die ram, ooi en hul lammetjie. Weens hul sku gewoontes, goeie kamoeflering en ruie habitat, is hul gedragpatrone moeilik waarneembaar en is nie veel hieroor bekend nie²⁻⁴.

Suni's is skaam en versigtig en as hulle skielik gesteur word, sal hulle 'n tydjie bewegingloos staan, voor hulle 'n harde skree-geluid (chee-chee) maak en met vinnige sig-sag-bewegings na die naaste bosse of ruigte hardloop. Hulle is gewoonlik aktief gedurende die vroeë oggendure en laatmiddag. Gedurende die warmste tye van die dag lê hulle in die ruigtes¹. Suni's eet gewoonlik die punte van struik, grasse of vrugte wat geval het of nog aan die bome of bossies is. Hulle is onafhanklik van drinkwater aangesien hulle al hul nodige vloeistof uit hul voedsel kry. Hulle het, soos die ander klein anteloopspecies, 'n vinnige metabolisme en moet dus klein bietjies op 'n slag vreet met gereelde tussenposes⁵. Die wyfie is op ongeveer 16 maande seksueel volwasse en die ram op ongeveer 13 maande. Die wyfie is vir 7 maande dragtig en slegs 'n enkele lammetjie word gewoonlik in die somermaande, van Augustus tot Februarie, gebore^{3,6,7}. Suni-ooie is baie beskermend teenoor hul lammetjies. Oor die algemeen is die familieverband tussen die suni's onderling baie intiem. Dit kan duidelik gesien word aan die gereeldheid waarmee die suni's mekaar lek (moontlik ook met die funksie om mekaar se preorbitale klierafskeidings te ruik⁸) en die feit dat hulle dit geniet om naby mekaar te lê⁹.

Suni's is die prooi van arende, karnivore en luislange, maar meer suni's word deur strikke doodgemaak as deur roofdiere¹. Hulle is ook sensitief vir die vernietiging van die natuurlike omgewing vir landboudoeleindes. Dit het die verlies van hul habitat tot gevolg en hulle is 'n maklike prooi vir honde en valstrikke in sulke gebiede. In die teenwoordigheid van 'n oormaat blaarvreters soos die njala, word die lae bossies weggevreet en die skuiling wat die suni nodig het vir oorlewing verminder^{10,11}.

Die suni is 'n bedreigde spesie en teelprogramme is aan die gang gesit om die voortbestaan van die spesie te verseker. Die diere teel gelukkig relatief maklik aan in

aanhouding en verskeie suni's is al deur die Nasionale Dieretuin aan die Nasionale Krugerwildtuin geskenk om die suni-bevolking aan te vul^{12,13}.

Daar is ten minste drie wyses waarop die suni sy teenwoordigheid olfaktoriese aandui, naamlik met behulp van die afscheidings van besonder prominente preorbitale kliere wat met kort haartjies bedek is en net voor die oë voorkom^{4,6}, afscheidings van die voetklier wat in die hoef voorkom en uitscheidingsprodukte, wat gewoonlik op mishope gedeponeer word.

'n Vorige studie het duidelik getoon⁴ dat suni's hul territoriale gebied op olfaktoriese wyse aandui en dat die ram hoofsaaklik verantwoordelik is vir die afbakening van die gebied, meestal met behulp van sy preorbitale kliere. Die preorbitale klierafskeiding is 'n taaierige stof wat reukloos is vir die mens en waarskynlik gebruik word vir territoriale afbakening¹⁴. In vergelyking met ander Artiodactyla is die metode van merk by die suni ongewoon in die sin dat slegs een klier gebruik word tydens die merkproses en dat die merkproses meestal uit slegs 'n enkele beweging van die kop bestaan en nie uit die herhaaldelike knik van die kop nie. Die reuk hou vir vier dae en kort, regop takkies wat in oop gebiede, weg van die paadjies voorkom, word gebruik as merkposte.

Suni-ramme se territoriale gebiede oorvleuel feitlik glad nie met mekaar nie, maar dit kan wel met die territoriale gebied van twee of meer ooie oorvleuel⁴. Ooie toon nie dieselfde besitlikheid oor hul gebied nie. Die territoriale gebiede se grootte wissel van 1 tot 4 hektaar in 'n goeie habitat en van 4 tot 10 hektaar in 'n swak habitat. Dominante ramme is die diere wat die heel meeste merk en 'n vergelyking van gaschromatogramme van hul preorbitale klierafscheidings met dié van ondergeskikte ramme toon duidelik dat die samestelling van die vlugtige komponente in die afscheidings verskil. Die voetklier word gewoonlik geassosieer met die roetes wat die suni in hul gebied loop en die uriene en fekale afscheidings van beide geslagte word op gemeenskaplike mishope in die gebied gedeponeer. Hulle is so ernstig om die regte mishoop te gebruik dat hulle soms in 'n ry staan en hul beurt afwag. Die gewoonte bestaan om die mishoop eers met heen-en-weer bewegings van 'n stywe voorbeen oop te krap en lank daaraan te ruik voor die betrokke individu sy eie bydrae lewer^{8,9}. Die mishope dien waarskynlik nie as metode van gebiedsafbakening nie, maar wanneer 'n

vreemde suni dit gebruik, sal die dominante ram die mishoop oopkrap met sy hoef en daaroor merk^{1,4}.

Gebiedsaafbakening vind plaas om verskeie redes. Dit kan dien as 'n afskrikmiddel, om selfvertroue van individue te verhoog, of om te help met selforiëntering. Dit kan ook dien as inligtingsbron van die gebiedbewoner en die individu kan deur sy opponent opgeweeg word sonder dat hy moontlik sy gebied hoef te verdedig¹⁵.

Fig. 2.2 en 2.3⁹ toon die suni-ooi in haar natuurlike omgewing. Die suni is goed gekamoeleer en selfs in die oopte nie maklik sigbaar nie.

CHEMIESE KARAKTERISERING VAN DIE PREORBITALE AFSKEIDING

Die preorbitale afskeiding van die suni-ooi is versamel van diere wat in die Tygerberg dieretuin gehuisves is. Aanvanklik is die afskeiding met behulp van 'n teflonlepel verwyder, maar later is van voorafgereinigde gasies gebruik gemaak. Die afskeiding-bevattende gasies is met behulp van dichlorometaan geëkstraheer en gaschromatografies (GC) en gaschromatografies-massaspektrometries (GC-MS) geanaliseer met behulp van 'n kapillêre kolom wat met PS-089-OH as stasionêre fase belaag is. Tydens 'n vorige studie⁷ is 'n paar sure (C14-C16, C18, C20, C22 en bensoësuur) reeds in die preorbitale afskeiding van die suni-ooi geïdentifiseer en drie hoofkomponente waargeneem, waarvan een cholesterol was en die ander twee, met 'n basispiek by m/z 153 nie op grond van massaspektrometriese data geïdentifiseer kon word nie. Pogings om die twee onbekende hoofkomponente met behulp van preparatiewe gaschromatografie vir KMR-doeleindes te skei, het misluk⁷ en in hierdie studie is alternatiewe analitiese- en skeidingsmetodes ondersoek. Aanvanklik is GC-IR as alternatiewe identifikasie tegniek gebruik, maar die resultate was steeds nie bevredigend nie en daar is tot die slotsom gekom dat KMR steeds die beste analitiese metode vir hierdie verbindings sou wees. 'n KMR-analise van 'n ekstrak van die totale afskeiding was oninterpreteerbaar en 'n skeidingsmetode moes gevind word. Aanvanklik is 'n poging aangewend om die sure te skei van die vetagtige komponente in die afskeiding deur die sure in soutvorm te verkry, met water te ekstraheer, die waterlaag weer aan te suur en die sure daarna met gedeutereerde



Figuur 2.2: Die suni-ooi, *Neotragus moschatus*. Die preorbitale kliere kan voor die oë waargeneem word. (Foto: Jan Rodrigues)⁹.



Figuur 2.3: Die suni-ooi in haar natuurlike habitat. (Foto: Jan Rodrigues)⁹.

chloroform te ekstraheer. Aanvanklik is vermoed dat die twee onbekende hoofkomponente onversadigde sure is en aangesien die KMR-spektrum van die geëkstraheerde waterlaag nie duidelike tekens van onversadiging getoon het nie, is tot die slotsom gekom dat dié skeidingsmetode oneffektief was. In 'n later stadium is tot die gevolgtrekking gekom dat die hoofkomponente nie onversadig is nie en dat bogenoemde skeidingsmetode dus tog relatief effektief was. 'n Suksesvolle skeiding kon wel met behulp van preparatiewe hoëdruk vloeistofchromatografie (HPLC) bewerkstellig word. ^{13}C - en ^1H -KMR-analises van fraksies wat met behulp van HPLC opgevang is, was eenvoudiger en gedeeltelike interpretasie hiervan was moontlik. Hoë resolusie massaspektrometrie (HRMS) is gebruik om die molekulêre formules en massas van verskeie ioonfragmente vas te stel en die molekulêre massas van die twee hoofkomponente te bevestig. Ander minder prominente verbindings ('n paar sure, hidroksiësters en enkele ander) in die preorbitale afskeiding van die suni-ooi is met behulp van lae resolusie elektron-impak-massaspektrometrie (EI-MS) en deur bevestiging van gaschromatografiese retensietye geïdentifiseer.

Fig. 2.4 toon die totale ioonstroomchromatogram (TIC) van die preorbitale afskeiding van die suni-ooi. Die drie hoofkomponente is duidelik sigbaar. 'n Meer gedetailleerde TIC kan gesien word in Fig. 2.5. Die retensietye van die komponente wat hieronder bespreek word, kom hierop voor.

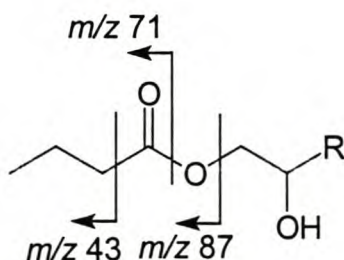
Alifatiese Hidroksiësters

Alifatiese Hidroksibutanoate

Die onderlinge ooreenstemming tussen die EI-massaspektra van komponente 6688, 6744, 6952, 7009, 7184, 7248 en 7599 (Fig. 2.8, 2.9, 2.11, 2.12, 2.13, 2.14 en 2.17) in die totale ioonstroomchromatogram (TIC) (Fig. 2.4-2.6) is besonder goed en daar kan dus afgelei word dat hulle tot dieselfde homoloë groep verbindings behoort. Buiten 'n basispiek by m/z 71, bevat elke massaspektrum ook prominente pieke by m/z 43, 87, 102 en 131. Komponente 6825 (Fig. 2.10), 7281 (Fig. 2.15) en 7348 (Fig. 2.16) behoort op die oog af ook tot hierdie groep, maar prominente pieke by m/z 55 en 69 dui op moontlike onversadiging wat nie by die ander sewe komponente gevind word nie. Hulle sal dus nie saam met bogenoemde groep verbindings bespreek word nie,

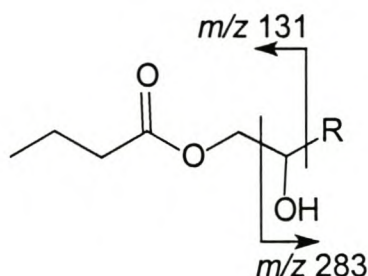
alhoewel baie van die ione wat in hulle massaspektra voorkom op dieselfde wyse gevorm word.

Die massaspektra van eersgenoemde groep komponente is soortgelyk aan die massaspektra van twee verskillende isomere van alifatiese hidroksiësters, naamlik 1-hidroksialkan-2-iel- of 2-hidroksialkan-1-ielbutanoate, wat tydens vorige studies^{16,17,18} in soogdierafskeidings geïdentifiseer is. Die massaspektra van 1-hidroksialkan-2-iel- en 2-hidroksialkan-1-ielesters bevat soortgelyke ione en komponente 6688 en 6744 se massaspektra (Fig. 2.8 en 2.9) sal afsonderlik bespreek word as verteenwoordigend van die twee groepe verbindings. Indien hierdie veronderstelling korrek is, kan die vorming van die basispiek in die massaspektra van hierdie verbindings toegeskryf word aan α -klowing met eliminasië van die alkohol-gedeelte van die hidroksiëster. Die identiteit van die ester-gedeelte van die hidroksiëster kan bepaal word met behulp van die basispiek¹⁸. Basispieke by m/z 43, 57, 71 of 85 in die massaspektra van hierdie verbindings kan aanvaar word as bewys dat die verbindings onderskeidelik 'n asetaat, propanoat, butanoat of pentanoat is. In die geval van komponent 6744 dui die basispiek by m/z 71 dus daarop dat hierdie komponent 'n alifatiese hidroksibutanoat is. Die vorming van die ionfragmente met m/z 43 en 71 as gevolg van α -klowing, en m/z 87 weens die verlies van die karboksiesuurgedeelte, kan as volg geformuleer word^{17,18}:

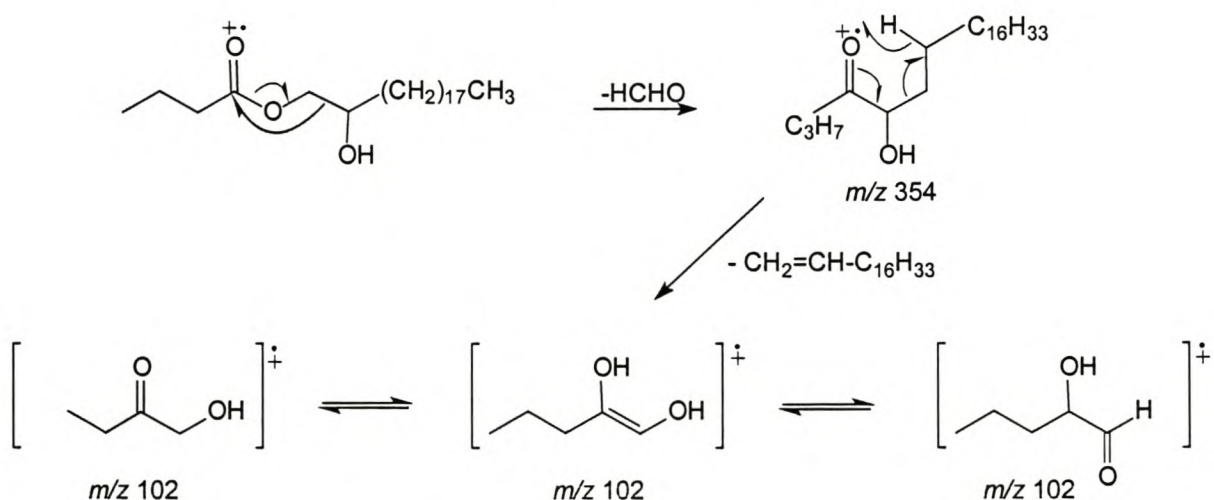


Die molekulêre ion van komponent 6744 kan, soos tipies in die geval van alkohole¹⁹, nie waargeneem word nie en die molekulêre massa van hierdie verbinding is met behulp van die prominente m/z 283 piek in die hoë massagebied van hierdie komponent bepaal. Indien van die veronderstelling uitgegaan word dat komponent 6744 'n 2-hidroksialkan-1-ielbutanoat is, is die vorming van 'n relatief stabiele $(M - 101)^+$ -ioon by m/z 283 'n sterk waarskynlikheid. Die molekulêre massa sou dan 384 Da wees en komponent 6744 is dus tentatief as 2-hidroksiïkos-1-ielbutanoat

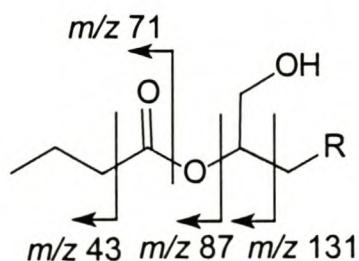
geïdentifiseer. Die fragmentione by m/z 131 en 283 word gevorm soos hieronder aangedui. Die ion by m/z 382 verskaf inligting aangaande die posisie van die hidroksigroep in die alkoholfunksie van hierdie verbinding.



Eliminasie van 'n molekule formaldehid en 'n daaropvolgende McLafferty herrangskikking gee aanleiding tot die vorming van die fragmentioon by m/z 102. Die teenwoordigheid van hierdie kenmerkende ion lewer bewys dat daar nie 'n hidroksielgroep in die suurgedeelte van die ester teenwoordig is nie^{16,18}.



In die massaspektrum van komponent 6688 word die ionfragmente by m/z 43, 71, 87 en 102 (vergelyk bostaande reaksieskema) op soortgelyke wyse gevorm as in die geval van komponent 6744.



Die molekulêre ioon van komponent 6688 is ook nie sigbaar nie en die voorkoms van die ioon by m/z 283 kan nie verklaar word in terme van die voorgestelde struktuur van komponent 6688 nie en is moontlik 'n teken van omskakeling tussen die twee isomere in die ioonbron van die massaspektrometer^{18,20}.

Na aanleiding van die vergelyking van retensietye van sintetiese hidroksialkanielbutanoate met korter kettinglengtes, is gevind dat 1-hidroksialkan-2-ielbutanoate voor 2-hidroksialkan-1-ielbutanoate elueer en dat hidroksialkaniel-2-metielpropanoate voor die hidroksialkanielbutanoate elueer. Met behulp van die vergelyking van verskille in retensietye en massaspektra, is komponente 6688, 6952 en 7184 as 1-hidroksialkan-2-ielbutanoate en komponente 6744, 7009, 7248 en 7599 as 2-hidroksialkan-1-ielbutanoate geïdentifiseer. Die identiteite van die onderskeie komponente is met behulp van die $(M - 101)^+$ -pieke bepaal. Die $(M - 101)^+$ -piek kom voor by die 1-hidroksialkan-2-iel- sowel as die 2-hidroksialkan-1-ielbutanoate en dit kon dus in beide gevalle gebruik word om die molekulêre massa te bepaal. Die m/z -waardes van die $(M - 101)^+$ -ione en die afgeleide molekulêre massas van die onderskeie komponente, word in Tabel 2.1 gegee. Komponente 6825, 7281 en 7348 is as onversadigde hidroksibutanoate geïdentifiseer op grond van hul massaspektra.

Tabel 2.1: Identifikasie van alifatiese hidroksibutanoate.

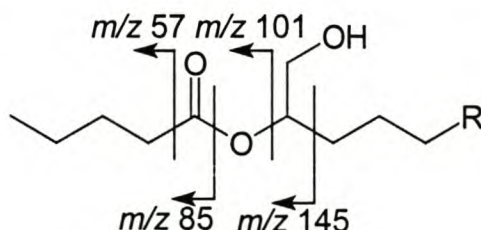
Identifikasie van alifatiese hidroksibutanoate			
RT	$(M - 101)^+$	M^+	Tipe verbinding
6688	283	384	1-Hidroksiïkos-2-ielbutanoaat
6744	283	384	2-Hidroksiïkos-1-ielbutanoaat
6825			Onversadigde hidroksibutanoaat
6952	297	398	1-Hidroksihenikos-2-ielbutanoaat
7009	297	398	2-Hidroksihenikos-1-ielbutanoaat
7184	311	412	1-Hidroksidokos-2-ielbutanoaat
7248	311	412	2-Hidroksidokos-1-ielbutanoaat
7281			Onversadigde hidroksibutanoaat
7348			Onversadigde hidroksibutanoaat
7599	325	426	2-Hidroksitrikos-1-ielbutanoaat

Alifatiese Hidroksipentanoate

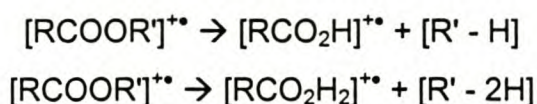
Die massaspektra van komponente 6907, 6966, 7052, 7456, 7537, 7667, 7902 en 8391 (Fig. 2.18-2.25) in die TIC van die preorbitale afskeiding van die suni-ooi (Fig. 2.4, 2.5 en 2.7), bevat ione by m/z 57 en 85 wat tipies is vir die hidroksipentanoate wat reeds in vorige studies geïdentifiseer is^{18,20}. Soos by die groep hidroksibutanoate is hier ook 'n paar uitsonderings. Komponente 7052 en 7667 bevat ione by m/z 55 en 69 en die moontlikheid dat hierdie komponente onversadigde hidroksiësters is, kan nie uitgesluit word nie.

Weens die onderlinge ooreenstemming tussen retensietye en massaspektra kan komponente 7456 en 7537 as isomere beskou word. Om redes wat later bespreek sal word (byvoorbeeld die intensiteit van die m/z 116 piek), is komponent 7456 tentatief as die 1-hidroksialk-2-ielpentanoaat en komponent 7537 as die 2-hidroksialk-1-ielpentanoaat geïdentifiseer. Die vorming van die fragmente van komponent 7456, verteenwoordigend van die groep 1-hidroksialkan-2-ielpentanoate, sal eerste bespreek word.

Die vorming van die ione by m/z 57, 85, 101 en 145 in die massaspektrum van komponent 7456 (Fig. 2.21) vind waarskynlik analoog aan die vorming van die ione by m/z 43, 71, 87 en 131 in die spektrum van die alifatiese hidroksibutanoate plaas.

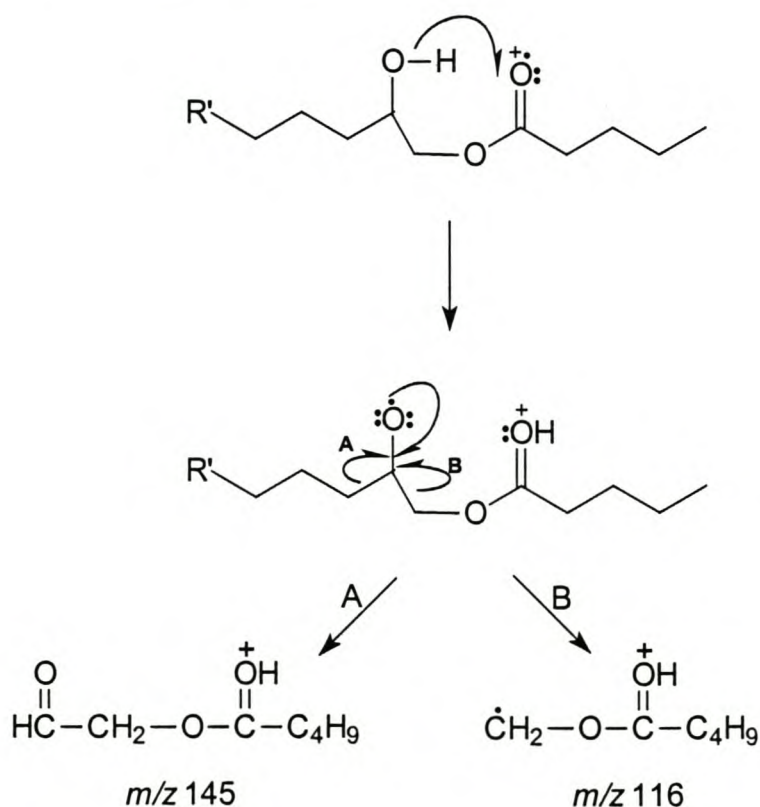


Die twee mees algemene fragmentasie reaksies vir esters met 'n alkohol gedeelte van etiel- of hoër, is gewoonlik as volg: die verlies van die alkylfragment van die alkoholgedeelte met die oordrag van een of twee H atome om onderskeidelik 'n karboksielsuur en 'n geprotoneerde karboksielsuurioon te produseer²¹.

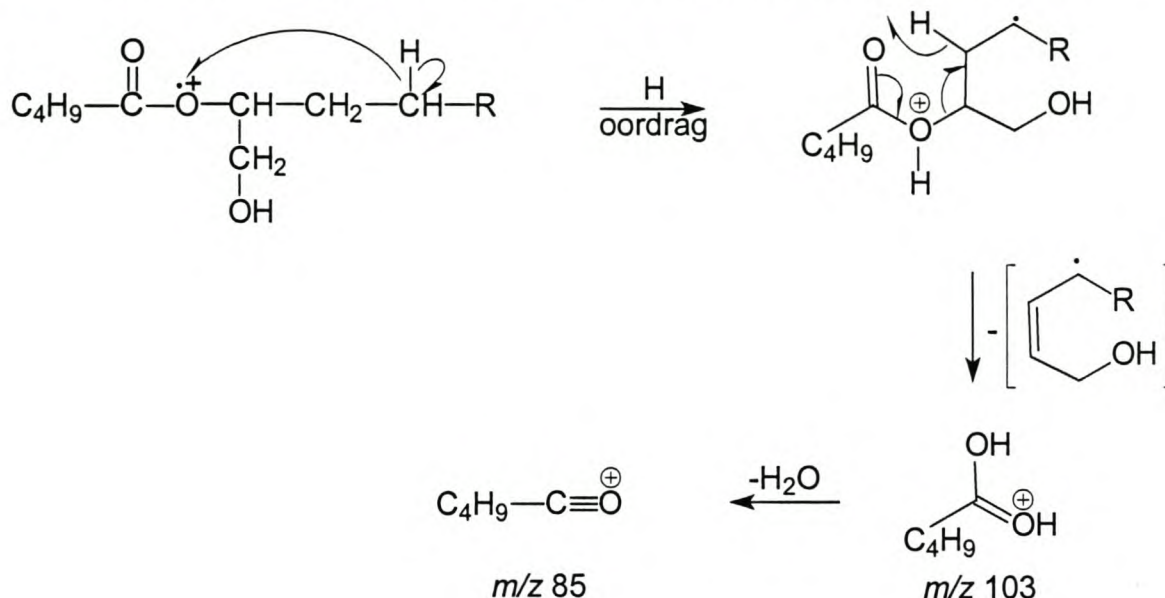


Die hoë intensiteit van die ion by m/z 85 is in ooreenstemming met resultate van eksperimente wat toon dat die verlies van die alkoksifragment die dominante klowingsproduk is in die fragmentasie van alkielesters^{22,23}.

By hidroksiësters waar die OH-groep ver van die COOR (R = alkielgroep) is word byvoorbeeld twee ionspesies gevorm. Die eerste ionspesie fragmenteer deur α -klowing op die volgende wyse: Die suurstof proton (dit is die proton van die hidroksielgroep) word deur die $RCOO^+$ -groep opgeneem om 'n geprotoneerde radikaal te vorm. Verdere klowing vind dan plaas deur splyting van een van die bindings wat α is met betrekking tot die oorspronklike OH-groep. Die vorming van 'n geprotoneerde ω -okso-suurester (m/z 145) (reaksie A) word bevoordeel teenoor vorming van die minder begunstigde ion by m/z 116 (reaksie B). 'n Verdere prominente klowingsreaksie lei tot die [McLafferty + 13]-fragment, terwyl die McLafferty-reaksie onderdruk word. Die rede hiervoor is die bevordering van protonoordrag vanaf die OH-groep na die karboniel-suurstof in teenstelling met die protonoordrag na die CH-groep²⁴.

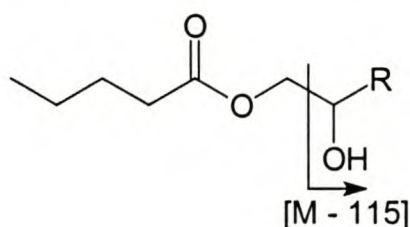


Wanneer protonoordrag van die alkoholgedeelte na die esterfunksie van die molekule plaasvind, en 'n McLafferty-herrangskikking hierop volg, word 'n geprotoneerde suur gevorm met m/z 103, wat na verlies van water 'n asielioon by m/z 85 vorm²⁵ addisioneel tot die ion by m/z 85 wat vorm weens α -klowing by die karboniel.

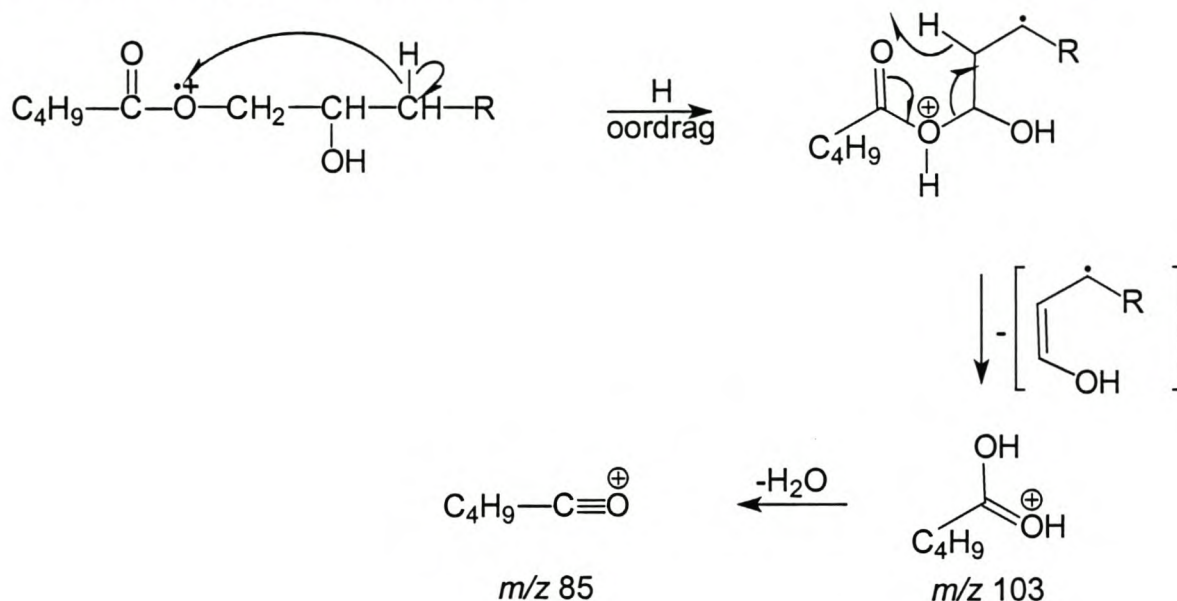


Die ion by m/z 311 in Fig. 2.21 kan nie verklaar word in terme van die struktuur van 1-hidroksialkan-2-ielpentanoaat nie, maar is wel karakteristiek vir 'n 2-hidroksialkan-1-ielpentanoaat en daar word voorgestel dat die twee komponente in ewewig bestaan en dat hulle moontlik in die bron van die massaspektrometer omskakel^{18,20}. Die m/z 116 ion kan in terme van die verlies van 'n formaldehyd molekule, gevolg deur 'n McLafferty-omskakeling, soos bespreek vir die analoë m/z 102 ion by die hidroksibutanoate, verklaar word.

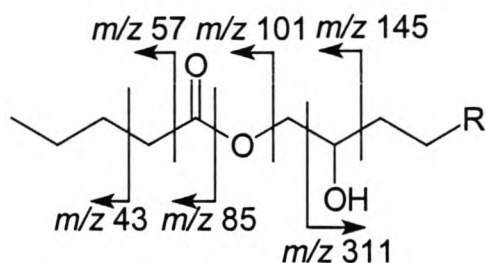
Die vorming van die $(M - 115)^+$ -ioon (analoog aan $(M - 101)^+$ by die hidroksibutanoate), in hierdie geval by m/z 311, kon soos voorheen gebruik word om die molekulêre massa van die hidroksipentanoate en dus hul identiteit af te lei en komponente 7456 en 7537 kon tentatief as 1-hidroksidokos-2-ielpentanoaat en 2-hidroksidokos-1-ielpentanoaat onderskeidelik geïdentifiseer word.



Soos in die geval van 1-hidroksidokos-2-ielpentanoaat (komponent 7456), word die basispiek by m/z 85 ook in die geval van komponent 7537 gevorm deur beide α -klowing van die C-O-binding langs die karbonielgroep, sowel as die vorming van die geprotoneerde suur gevolg deur die verlies van 'n watermolekuul. Laasgenoemde proses kan as volg geïllustreer word:



Die minder begunstigde α -klowingsproduk is teenwoordig by m/z 57. Die pieke by m/z 101 en 43 is die produkte van β -klowing terwyl die piek by m/z 311 as gevolg van γ -splyting ontstaan:



Die teenwoordigheid van die ion by m/z 311 verskaf inligting aangaande die posisie van die hidroksi-groep.

Die hidroksipentanoate wat in die preorbitale afskeiding van die suni-ooi voorkom, hul molekulêre massas en $(M - 115)^+$ -waardes verskyn in Tabel 2.2. Komponente 7052 en

7667 is as onversadigde hidroksipentanoate geklassifiseer. Bevestiging van die identiteit van hierdie komponente met behulp van retensietydvergelyking was nie moontlik nie weens gebrek aan sintetiese verbindings.

Tabel 2.2: Identifikasie van alifatiese hidroksipentanoate.

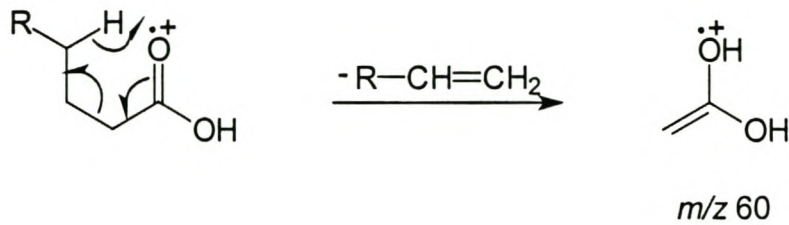
Identifikasie van alifatiese hidroksipentanoate			
RT	(M - 115) ⁺	M ⁺	Tipe verbinding
6907	283	398	1-Hidroksiïkos-2-ielpentanoaat
6966	283	398	2-Hidroksiïkos-1-ielpentanoaat
7052			Onversadigde hidroksipentanoaat
7456	311	426	1-Hidroksidokos-2-ielpentanoaat
7537	311	426	2-Hidroksidokos-1-ielpentanoaat
7667			Onversadigde hidroksipentanoaat
7902	325	440	2-Hidroksitrikos-1-ielpentanoaat
8391	339	454	2-Hidroksitetrakos-1-ielpentanoaat

Onvertakte Alifatiese Karboksielsure

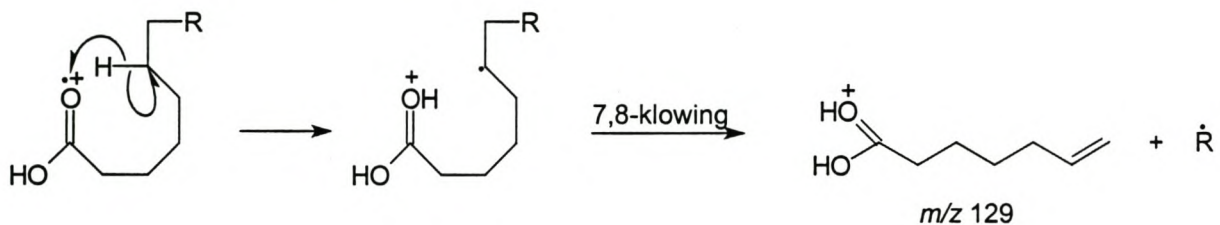
Versadigde sure

Die massaspektra van komponente 4137, 4797, 5114, 5404, 5971, 6235, 6490, 6733 en 6984 (Fig. 2.27-2.35) in die TIC (Fig. 2.4, 2.5 en 2.26) bevat redelik prominente pieke by m/z 60, 73 en 129, wat tipies is vir alifatiese karboksielsure. Al die komponente wat as sure geïdentifiseer is, is aangedui deur 'n * bo die betrokke pieke in die TIC (Fig. 2.26). Uit die enkelioonstroomchromatogram vir m/z 60 van komponent 6733 (Fig. 2.36) kan gesien word dat hierdie komponent en komponent 6744 gedeeltelik ko-elueer, wat 'n paar atipiese pieke in die massaspektrum van die suur 6733 (Fig. 2.34) verklaar.

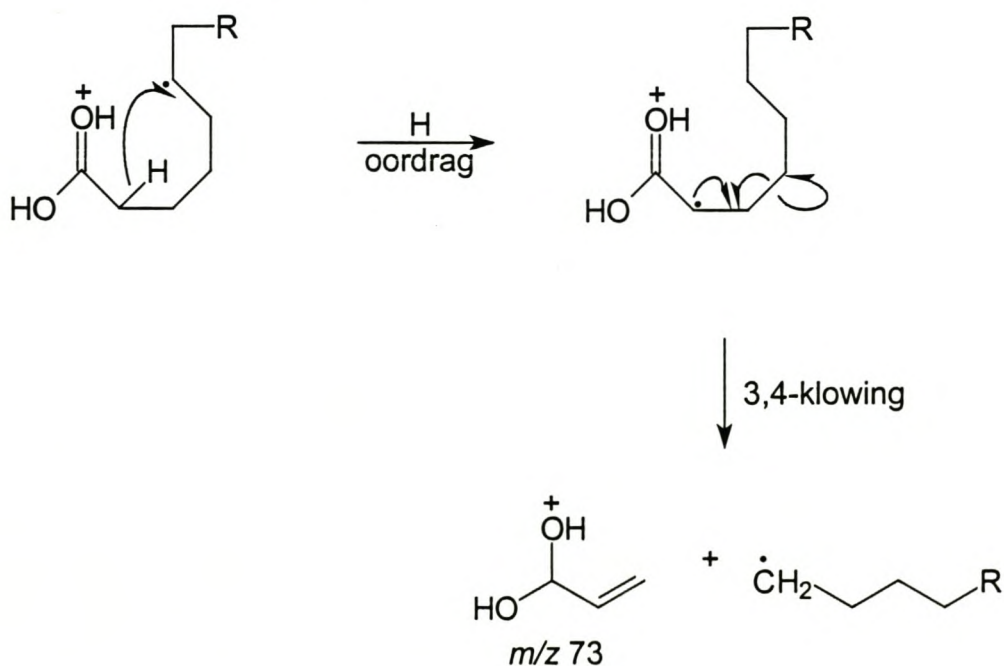
Die EI-spektrum van komponent 4797 (Fig. 2.28) sal bespreek word as verteenwoordigend van hierdie reeks komponente. Die molekulêre ionpiek (M⁺) van alifatiese karboksielsure is relatief prominent en die intensiteit daarvan neem toe met toename in molekulêre massa. Die molekulêre ion is duidelik sigbaar by m/z 256 en komponent 4797 is gevolglik as heksadekanoësuur geïdentifiseer. Die m/z 60 ion word gevorm deur 'n McLafferty-herrangskikking en is 'n aanduiding dat geen substituent op die α -koolstofatoom van die suur voorkom nie²⁶. Die McLafferty-herrangskikking vind soos volg plaas^{26,27,28}.



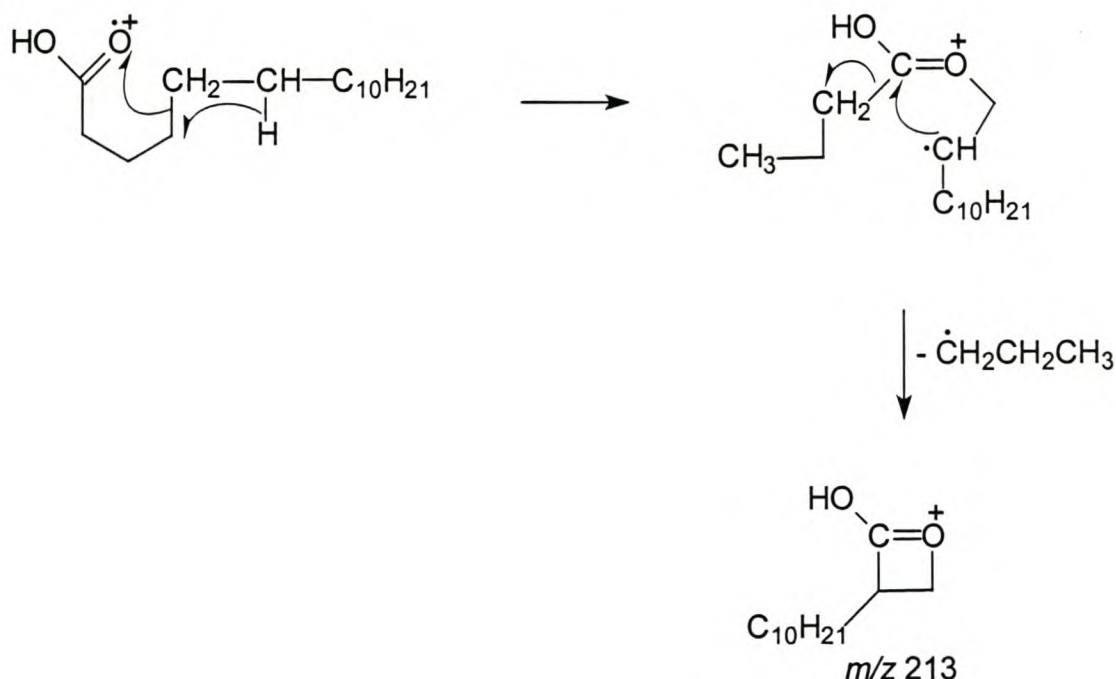
Die m/z 73 en m/z 129 ione vorm deel van die reeks m/z 73, 115, 129, 143,..., vir fragmente wat gevorm word deur proton-oordrag vanaf verskillende koolstofatome in die koolstofketting met gepaardgaande homolise van 'n binding wat α is met betrekking tot die betrokke koolstofatoom. So word die m/z 129 piek deur 7,8-klowing en die m/z 73 piek deur 3,4-klowing gevorm^{27,28,29}.



Die prominensie van die m/z 73-piek kan toegeskryf word aan die hoogs stabiele α,β -onversadigde geprotoneerde karbonielsisteem wat die produk is van die fragmentasiereaksie van hierdie ion²⁷.



Eliminasie van 'n fragment wat C-2, C-3 en C-4 bevat, lewer 'n $(M - 43)^+$ piek by m/z 213 in die massaspektrum van komponent 4797. Hierdie eliminasië is die gevolg van protonoordrag vanaf die C-6 na die C-4 atoom en die reaksiemeganisme kan as volg voorgestel word^{27,28}:



Komponente 4137, 4797, 5114, 5404, 5971, 6235, 6490, 6733 en 6984 is op grond van bogenoemde fragmentasiereaksies, vergelyking met 'n rekenaarbiblioteek van massaspektra en vergelyking van retensietye met dié van die kommersieel beskikbare verbindings, geïdentifiseer as tetradekanoësuur, heksadekanoësuur, heptadekanoësuur, oktadekanoësuur, ikosanoësuur, henikosanoësuur, dokosanoësuur, trikosanoësuur en tetrakosanoësuur, respektiewelik.

Onversadigde sure

In die EI-massaspektra van komponente 5311 (Fig. 2.37) en 5327 (Fig. 2.38) is die m/z 60-piek heelwat kleiner as by die versadigde sure. Komponent 5327 bevat ook nog 'n relatief prominente reeks pieke by m/z 41, 55, 69, 83, 97, ..., wat ooreenstem met die algemene formule C_nH_{2n} en karakteristiek is vir enkel-onversadiging in die koolstofketting³⁰. Die m/z 283-piek in die massaspektrum van komponent 5327 kan toegeskryf word aan die $(M+1)^+$ -ioon, terwyl 'n duidelike molekulêre ioon by m/z 282 die vermoede versterk het dat hierdie verbinding 'n oktadekenoësuur is. Aangesien (Z)-9-oktadekenoësuur al in die verlede in soogdierafscheidings gevind is^{30,31}, is vermoed dat

die onversadiging by hierdie posisie kan wees en daar kon met retensietyd-vergelyking bevestig word dat komponent 5327 oleïensuur, oftewel (Z)-9-oktadekanoësuur, is.

Buiten die swak m/z 60-piek wat in die massaspektrum van komponent 5311 (Fig. 2.37) gevind word, kom nog 'n reeks pieke by m/z 67, 81, 95, ..., voor wat dui op dubbel-onversadiging en voorafgegaan word deur die twee pieke by m/z 41 en 55 wat enkel-onversadiging impliseer. Die molekulêre ioon by m/z 280 bevestig dan ook die vermoede dat dit 'n oktadekadiënoësuur is en na vergelyking met literatuurdata en vorige bevindinge by soogdierafskedings³¹, is komponent 5311 tentatief as (9Z,12Z)-oktadekadiënoësuur, oftewel linoleïensuur, geïdentifiseer. Dit is ook deur retensietydvergelyking met sintetiese (9Z,12Z)-oktadekadiënoësuur bevestig.

Vertakte Alifatiese Karboksiësure

Die massaspektra van komponente 5876, 6163, 6397 en 6888 (Fig. 2.39-2.42) in die TIC (Fig. 2.4, 2.5 en 2.26) toon almal die tipiese m/z 60, 73 en 129-pieke van karboksiësure, maar hul retensietye stem nie ooreen met dié van die versadigde reguitkettingsure nie. Die moontlikheid van onversadiging is uitgesluit aangesien die molekulêre ione van hierdie komponente dui op versadigde sure. Die moontlikheid dat hierdie verbindings vertakte sure kan wees, is oorweeg. In 'n vorige studie is iso- en anteïsoësure in soogdierafskedings geïdentifiseer³⁰ en hierdie moontlikheid is dus ondersoek. 'n Reeks kommersiële sintetiese isosure van 12-metieltridekanoësuur (isotetradekanoësuur) tot by 19-metielikosanoësuur (isohenikosanoësuur) was beskikbaar, sowel as 'n reeks anteïsoësure, van 11-metieltridekanoësuur (anteïso-tetradekanoësuur) tot by 15-metielheptadekanoësuur, oftewel anteïso-oktadekanoësuur. Aangesien die retensietye van moontlike vertakte sure in die afskeiding almal langer is as dié van nonadekanoësuur, sou direkte retensietydvergelyking met die beskikbare sintetiese verbindings slegs moontlik wees in die geval van dié isosure wat 'n kettinglengte het van minder as 21 koolstofatome. 'n Alternatiewe benadering moes dus gevolg word.

Die identiteit van die vier vertakte sure is deur middel van indirekte gaschromatografiese retensietydbepaling bevestig deur gebruik te maak van kalibrasiekurwes van retensietyd vs kettinglengte van die sure. Hierdie

kalibrasiekurwes is afsonderlik vir normaal-, iso- en anteïsosure opgestel. Dit is gedoen deur 'n mengsel van die beskikbare sintetiese sure in te spuit, die retensietye daarvan te verkry, punte te stip van retensietyd (RT) vs kettinglengte (n) en 'n kwadratiese polinoom deur die punte te pas (sien Fig. 2.43-2.45). Die R^2 -waarde van elke grafiek is 'n maatstaf van akkuraatheid van die polinoom se passing en kan wissel van 0 vir uiters swak passing tot 1 vir perfekte passing. Met behulp van die rekenaarprogram *Excel* is die R^2 -waardes vir elke grafiek bereken en was die passing van die polinome perfek ($R^2 = 1$) vir al drie tipes sure (normaal-, iso- en anteïsosure, Fig. 2.43-2.45). Hierdie kalibrasiekurwes kon nou voorwaarts geëkstrapoleer word en langer kettinglengtes se geskatte retensietye akkuraat afgelees word. Hierdie metode van indirekte retensietydbepaling kan slegs gebruik word indien die temperatuurprogram van die gaschromatograaf teen 'n konstante gradiënt loop. In hierdie geval styg die temperatuur vir 120 minute teen 2°C per minuut, waarna die temperatuur konstant bly vir 60 minute. Die retensietydkremente tussen lede van 'n homoloë reeks in die isotermiese gebied verskil van dié in die temperatuurgeprogrammeerde gebied. Aangesien al die sure in die afskeiding egter gedurende die temperatuurprogram (dit is voor 120 minute) elueer, kon die kalibrasiekurwes gebruik word vir die indirekte retensietydbepaling van hierdie sure. Dit is gedoen deur die retensietyd (RT) van die onderskeie sure vanaf die kurwes af te lees by die ooreenstemmende kettinglengte, of die retensietyd te bepaal deur die kettinglengte (n) in die vergelyking van die geïnterpoleerde polinoom in te stel en die waarskynlike retensietyd (y) so te bereken. In Tabel 2.3 verskyn die koolstofkettinglengtes (n) en retensietydwaardes (RT) waarmee die kalibrasiekurwes opgestel is, asook die berekende waardes en die retensietye van die sure in die preorbitale afskeiding.

Die kettinglengtes van sure wat op hierdie wyse bepaal is, is bevestig deur die molekulêre ionen van die betrokke sure. Op hierdie wyse is bevestig dat komponente 5876, 6163, 6397 en 6888 wel iso- of anteïsosure is. Daar kon egter eers na fyner vergelyking van retensietye tussen die beskikbare normaal-, iso- en anteïsosure met sekerheid gesê word dat komponente 5876, 6163, 6397 en 6888 almal isosure is en wel 18-metielnonadekanoësuur (isoïkosanoësuur), 19-metielikosanoësuur (isohenikosanoësuur), 20-metielhenikosanoësuur (isodokosanoësuur) en 22-metieltrikosanoësuur (isotetrakosanoësuur), onderskeidelik.

Tabel 2.3 Koolstofkettinglengtes (n) en retensietye (RT) vir die kalibrasie kurwes, sowel as waardes wat bereken is met behulp van die kalibrasiekurwes en die retensietye van die sure wat in die preorbitale afskeiding van die suni-ooi geïdentifiseer is.

Normaal-sure C_n			Isosure C_n			Anteïsosure C_n		
N	RT _{eksp} (min)	RT _{suni} (min)	n	RT _{eksp} (min)	RT _{suni} (min)	n	RT _{eksp} (min)	RT _{suni} (min)
14	69.0	69.0	14	67.7	-	14	68.2	-
15	-	-	15	73.3	-	15	73.7	-
16	80.0	80.0	16	78.4	-	16	79.0	-
17	85.2	85.2	17	83.6	-	17	84.1	-
18	90.1	90.1	18	88.5	-	18	89.1	-
19	95.4	-	19	93.3	-	Bereken		-
20	100.0	99.5	20	97.9	97.9	n	RT	-
21	104.4	103.9	21	102.3	102.7	19	93.8	-
22	108.6	108.2	Bereken		-	22	98.4	-
23	-	112.3	n RT = y (min)		-	21	102.8	-
24	116.5	116.4	22	106.6	106.6	22	107.0	-
			23	110.7	-	23	111.0	-
			24	114.6	114.8	24	114.8	-

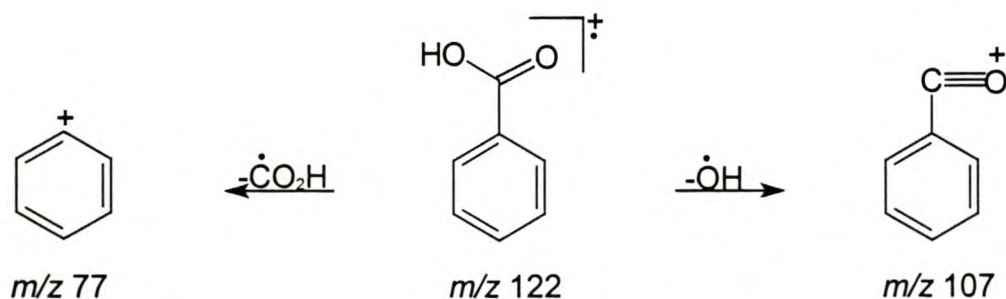
'n Lys van die alifatiese sure wat in die preorbitale afskeiding van die suni-ooi geïdentifiseer is, word in Tabel 2.4 gegee.

Tabel 2.4 Karboksielsure geïdentifiseer in die preorbitale afskeiding van die suni-ooi, *Neotragus moschatus*.

Komponent No.	Verbinding	Komponent No.	Verbinding
4137	Tetradekanoësuur	6163	19-Metielikosanoësuur
4797	Heksadekanoësuur	6235	Henikosanoësuur
5114	Heptadekanoësuur	6397	20-Metielhenikosanoësuur
5311	(9Z, 12Z)- Oktadekadiënoësuur	6490	Dokosanoësuur
5327	(Z)-9-Oktadekenoësuur	6733	Trikosanoësuur
5404	Oktadekanoësuur	6888	22-Metieltrikosanoësuur
5876	18-Metielnonadekanoësuur	6984	Tetrakosanoësuur
5971	lkosanoësuur		

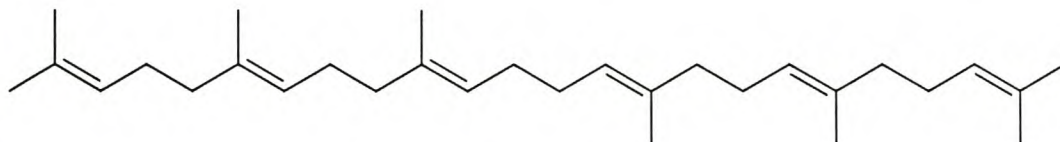
Bensoësuur

Die massaspektrum van bensoësuur bevat drie kenmerkende pieke by m/z 122, 105 en 77 wat ook in die massaspektrum van komponent 1863 (Fig. 2.46) voorkom. Hierdie massaspektrum stem ook in ander opsigte baie goed ooreen met dié van bensoësuur. Deur die retensietyd van hierdie komponent met dié van kommersieel beskikbare bensoësuur te vergelyk, kon die identifikasie finaal bevestig word. Die prominente fragmentione by m/z 105 en 77 word soos volg gevorm^{32,33}:



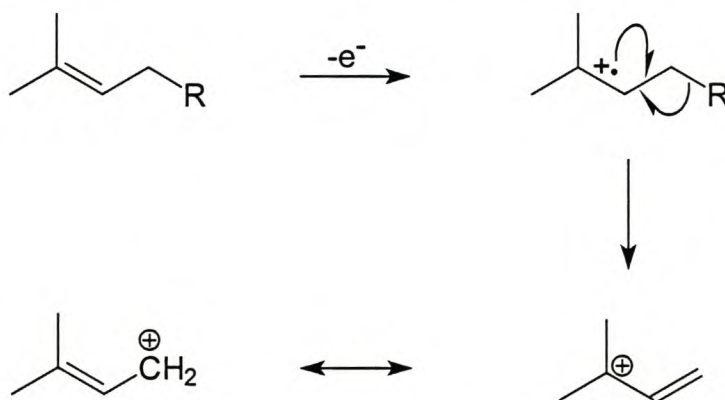
Skwaleen

Vergelyking van die massaspektrum van komponent 7107 (Fig. 2.47) met 'n rekenaargebaseerde biblioteek en literatuurdata^{34,35}, het getoon dat hierdie komponent moontlik skwaleen is. Skwaleen het 'n molekulêre massa van 410 en die molekulêre ionpiek is klein, maar duidelik waarneembaar.



Skwaleen

Die ontstaan van die basispiek by m/z 69 kan toegeskryf word aan 'n alliliese klowing wat aan beide ente van die simmetriese molekule kan plaasvind:

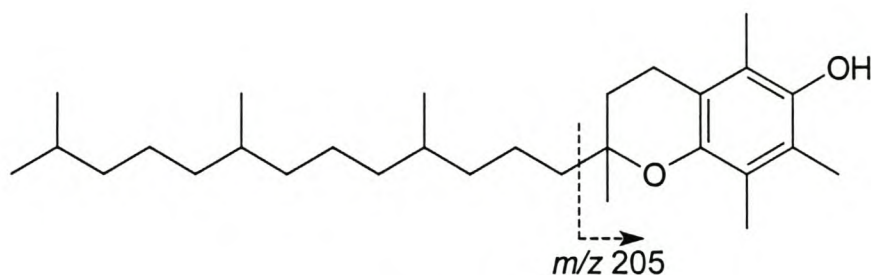


Die identiteit van komponent 7107 as skwaleen is bevestig met behulp van retensietydvergelyking met 'n sintetiese monster.

α -Tokoferol/Vitamien E

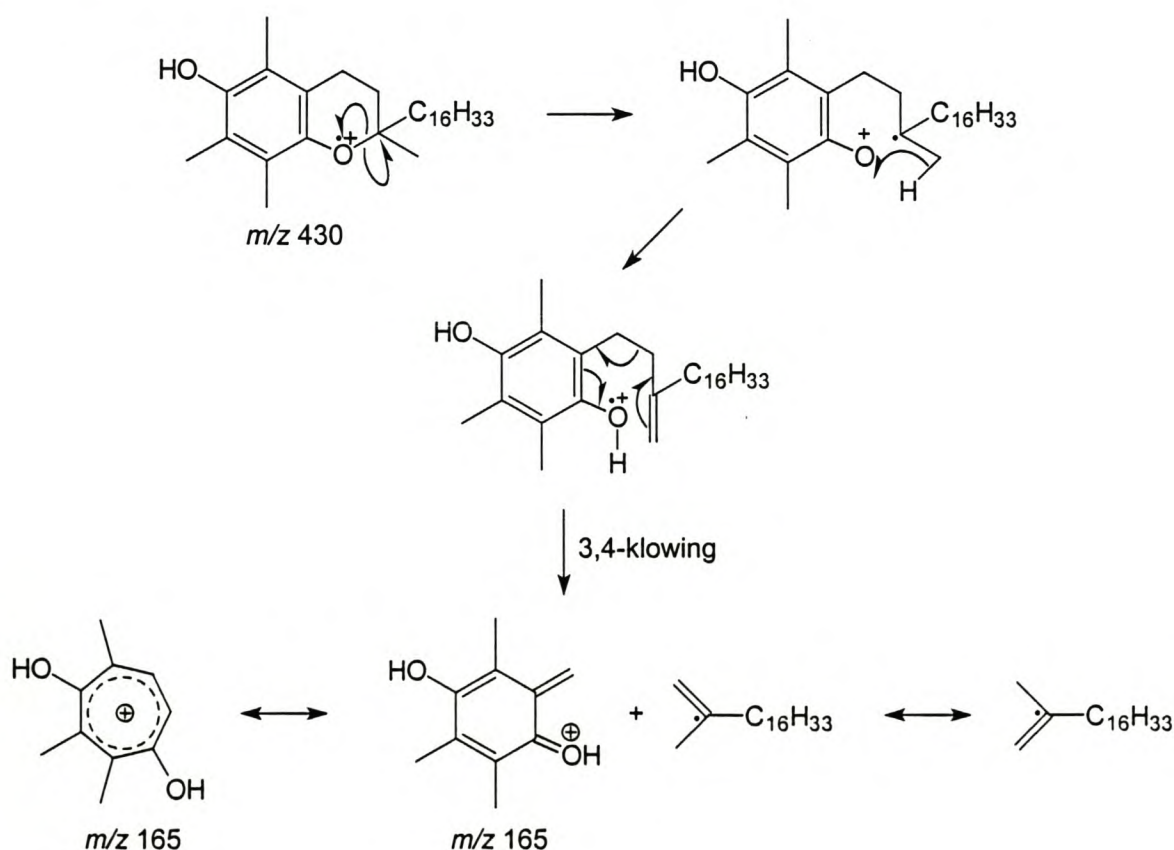
Komponent 8142 se massaspektrum (Fig. 2.48) toon 'n basispiek by m/z 165 en prominente pieke by m/z 205 en 430. Daar is aangeneem dat die ion by m/z 430 moontlik die molekulêre ion is. Van die prominente molekulêre ion sowel as die basispiek kan afgelei word dat hierdie verbinding óf siklies óf aromaties is³⁶. Deur vergelyking met data uit vorige studies^{37,38} kon hierdie verbinding voorlopig as α -

tokoferol of vitamien E geïdentifiseer word. Verdere bevestiging is verkry deur retensietydvergelyking met kommersieel beskikbare α -tokoferol.



α -Tokoferol

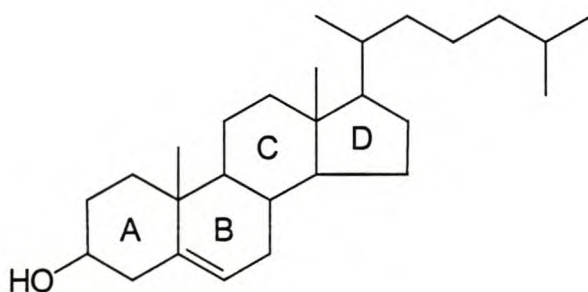
Die ion by m/z 205 ontstaan as gevolg van die verlies van die syketting terwyl die basispiek gevorm word deur 'n proses wat die klowing van die nie-aromatiese ring behels. Die splyting van die O-C-binding word aangedryf deur die gedeeltelike radikaalkatfoonkarakter van die suurstofatoom in die heterosikliese ring van die molekulêre ion. Protonoordrag van die metielgroep na die suurstofatoom vorm 'n kationradikaal wat na splyting van die oorspronklike C-3-C-4-binding, 'n ion by m/z 165 lewer³⁹:



Steroïede

Komponent 8074 is een van die drie hoofkomponente in die preorbitale afskeiding van die suni-ooi. Die massaspektrum van hierdie komponent (Fig. 2.49) bevat prominente ione by m/z 213, 231, 301, 353, 368 en 371 asook m/z 386, moontlik die molekulêre. Die ione by m/z 353, 368 en 371 sou onderskeidelik die fragmente $[M - (CH_3 + H_2O)]$, $(M - H_2O)$ en $(M - CH_3)$, wat kenmerkend is vir steroïed alkohole, kon verteenwoordig. Die ione by m/z 247 en m/z 275 word gevorm deur die klowing van ring B, terwyl die ion by m/z 301, $(M - 85)^+$, waarskynlik die gevolg is van die verlies van die syketting^{40,41}.

Die massaspektra van steroïede bevat gewoonlik 'n $(M - 72)^+$ piek weens verlies van ring A uit die molekulêre ion. By cholesterol vind hierdie verlies nie juis plaas nie en die piek by m/z 314 is baie swak en soms onsigbaar, aangesien die dubbelbinding in ring B ring A stabiliseer^{41,42}. Die ion by m/z 213 word gevorm deur die verlies van water, die syketting en ring D uit die molekulêre ion, terwyl die fragmentioon by m/z 231, $(213 + H_2O)$, deur 'n soortgelyke verlies, uitgesonderd die hidroksielgroep, ontstaan^{41,43}.

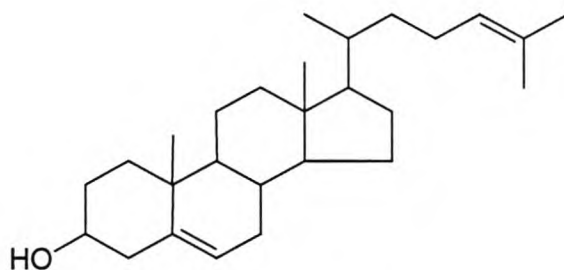


Cholesterol

Die identiteit van komponent 8074 as cholesterol is bevestig deur vergelyking van die komponent se gaschromatografiese retensietyd met dié van 'n kommersiële monster.

Uit die vergelyking van die massaspektra van komponente 8170 en 8234 (Fig. 2.50 en 2.51) met dié uit vorige studies^{42,43} blyk dat hierdie komponente ook steroïedverbindings is. Beide se massaspektra bevat sterk pieke wat die $(M - 15)^+$ - en

($M - 33$)⁺-fragmente verteenwoordig en die resultaat is van die verlies van 'n metielgroep gevolg deur die verlies van 'n molekule water. Die massaspektrum van komponent 8170 bevat 'n basispiek by m/z 69 en 'n prominente ioon by m/z 271 wat ooreenstem met die massaspektrum van desmosterol wat in vorige studies^{42,43} geïdentifiseer is. Die molekulêre massa van desmosterol is 384 Da en na verwagting behoort die molekulêre ioon van hierdie tipe polisikliese verbinding in die spektrum aanwesig te wees. Dit is dan ook die geval in die spektrum van komponent 8170 waar die molekulêre ioon swak, maar duidelik waarneembaar is by m/z 384⁴⁴.



Desmosterol

Die identiteit van komponent 8170 as desmosterol is bevestig met behulp van retensietydvergelyking met die kommersieel beskikbare verbinding.

Komponent 8234 kon nie geïdentifiseer word nie.

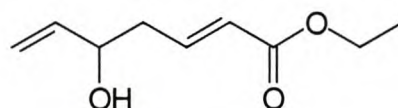
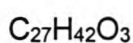
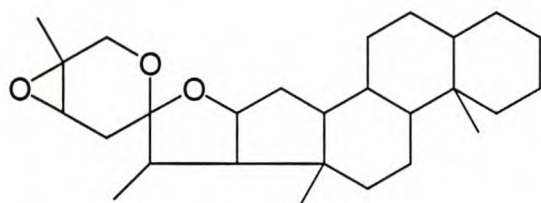
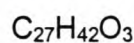
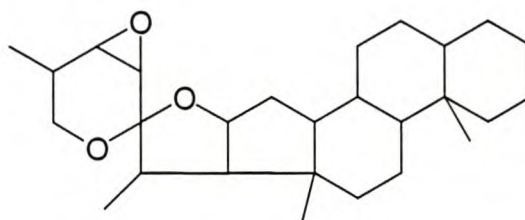
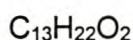
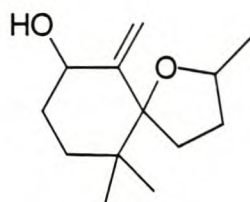
Hoofkomponente

Komponente 5009, 5642 en 8074 is die hoofkomponente van die preorbitale afskeiding van die suni-ooi. (Kyk Fig. 2.4 en 2.5). In 'n vorige studie⁴⁵ en soos reeds aangetoon, is komponent 8074 geïdentifiseer as cholesterol. Verskeie analitiese metodes is vir die identifikasie van komponente 5009 en 5642 aangewend.

Gaschromatografie-Massaspektrometrie

Die massaspektra van komponente 5009 en 5642 (Fig. 2.53 en 2.55) asook dié van vyf ander komponente (4378, 5263, 5857, 6129 en 6181) (Fig. 2.52, 2.54, 2.56-2.58) is verkry met behulp van GC-EI-MS analyses. Hulle het almal kenmerkende pieke by m/z 171, 153 (basispiek), 144, 135, 125, 111 en 107. Vergelyking van bogenoemde komponente se massaspektra met massaspektra uit verskeie databasisse, naamlik

NBS, LEC ('n massaspektrometriese databasis van die Laboratorium vir Ekologiese Chemie) en 'n Wiley-databasis, was nie baie suksesvol nie. Uit die LEC-databasis is 'n ooreenstemming van 64% tussen die massaspektrum van komponent 5009 en dié van 12-nonadeken-1-ielformiaat verkry. Vergelyking met massaspektra uit die Wiley-databasis het die beste resultate gelever en die volgende moontlikhede is voorgestel:



Etiel-5-hidroksi-2,6-heptadiënoaat

Etiel-5-hidroksi-2,6-heptadiënoaat is as die mees geskikte kandidaat gekies vir verdere oorweging van die beskikbare spektroskopiese en spektrometriese inligting, aangesien sy massaspektrum die beste ooreenstem met dié van komponente 5009 en 5642.

Chemiese Ionisasie Massaspektrometrie

Die molekulêre massa van komponente 5009 en 5642 is met behulp van chemiese ionisasie (CI) GC-MS bepaal as 240 Da vir komponent 5009 en 268 Da vir komponent 5642 (Fig. 2.59-2.61). Hierdie inligting, gekombineer met die voorafgaande redenasies, het daartoe aanleiding gegee dat komponente 5009 en 5642 tentatief as dubbel-onversadigde C_{14} - en C_{16} -hidroksi-sure geklassifiseer is.

Gaschromatografie-Infrarooispektrometrie

'n Gaschromatografies-infrarooispektrometriese analise (GC-FTIR) is met 'n ekstrak van die preorbitale afskeiding uitgevoer waarvolgens beide komponente 5009 en 5642 as sure geïdentifiseer is deur hul gasfase infrarooi-spektra (IR) (Fig. 2.62 en 2.63) te

vergelyk met dié van 'n verskeidenheid van verbindings, wat in 'n databasis beskikbaar was. IR-spektra van die verbindings uit bogenoemde databasis en spektra van die onbekende komponente (komponente 5009 en 5642 in Fig. 2.4) kom voor in Fig. 2.64-2.67. Tabel 2.5 bevat die inligting verkry vanaf die analise.

Tabel 2.5: Tentatiewe identifikasie van komponente 5009 en 5642 met behulp van GC-IR analise.

Komponent	Tentatiewe identifikasie	% Ooreenstemming (IR)
5009	Oktanoësuur	99.5
	4-Metieloktanoësuur	98
	Nonanoësuur	98
5642	Dekanoësuur	99
	Undekanoësuur	99
	(Z)-9-Tetradekenoësuur	98

Dit is interessant dat die IR spektra van so 'n wye verskeidenheid van sure, waaronder selfs 'n onversadigde suur so 'n goeie ooreenstemming met komponente 5009 en 5642 gee, maar daar moet in aanmerking geneem word dat die karbonielfrekwensies van laktone en vry sure in die gasfase spektra baie min verskil (byvoorbeeld dekaan-5-olied 1775 cm^{-1} en dekanoësuur 1778 cm^{-1}). Die moontlikheid dat hierdie komponente enige van bogenoemde sure kon wees, is onmiddellik uitgesluit, aangesien die retensietye van die sure wat in Tabel 2.5 verskyn, korter is as dié van die kortste suur wat reeds in die preorbitale afskeiding van die suni-ooi geïdentifiseer is (tetradekanoësuur, komponent 4137) en dus ook korter is as die retensietye van die komponente onder bespreking (komponente 5009 en 5642). Wat wel hiervan afgelei kon word is dat die komponente heel moontlik sure kon wees en hierdie kennis, gekombineer met die inligting wat verkry is vanaf die Wiley-databasis, het aanleiding gegee daartoe dat komponente 5009 en 5642 tentatief as onversadigde hidroksisure geklassifiseer is.

Die vorming van die basispiek in die spektrum sou dan byvoorbeeld verklaar kon word deur te aanvaar dat die ioon by m/z 153 'n geprotoneerde vorm van 'n triënoësuur ($\text{C}_9\text{H}_{13}\text{O}_2^+$) is wat ontstaan weens die verlies van 'n watermolekule vanaf die geprotoneerde onversadigde hidroksisuur met molekulêre formule $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_3^+$. Die molekulêre massa van die onversadigde hidroksisuur sou dan 170 Da kon wees en die ioon by m/z 171 sou 'n geprotoneerde vorm van hierdie verbinding kon verteenwoordig.

'n Literatuursoektog na die massaspektra van geskikte triënoësure was vrugtelos en die probleem sou dus nie op grond van GC-MS en GC-IR alleen opgelos kon word nie.

Kern Magnetiese Resonansie

As volgende analitiese metode is kern magnetiese resonansie (KMR) gebruik. Daar is van die redenasie uitgegaan dat die hoofkomponente so 'n groot persentasie van die afskeiding uitmaak dat die KMR spektra van die ander komponente in die afskeiding nie 'n noemenswaardige bydrae tot die spektrum van die totale afskeiding sou maak nie. Die KMR spektrum van cholesterol, die derde hoofkomponent, sou dus van die totale KMR spektrum afgetrek kon word aangesien dit uit die literatuur verkry kon word. Teoreties behoort die resulterende spektrum relatief eenvoudig te wees in die sin dat dit hoofsaaklik sou bestaan uit die KMR spektra van die twee onbekende hoofkomponente wat in elk geval aan mekaar verwant is. Dit sou die bydrae van die minder prominente komponente verder onderdruk en hipoteties gesproke behoort interpretasie moontlik te kon wees.

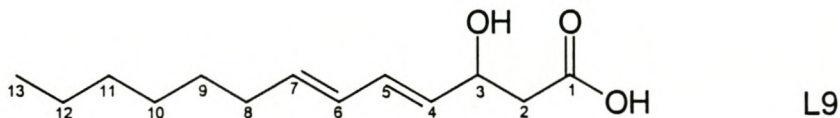
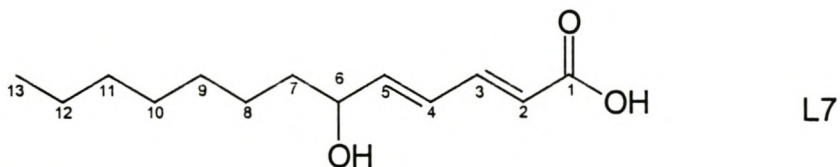
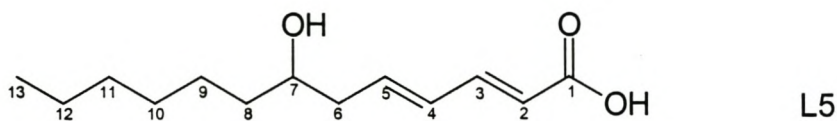
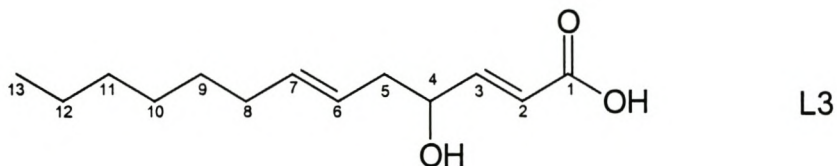
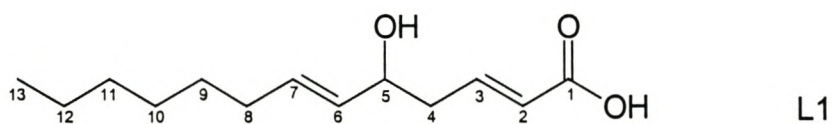
Die ^1H - en ^{13}C -KMR spektra van die totale ekstrak is opgeneem (Fig. 2.68 en 2.69) asook die APT (Attached Proton Test) spektrum (Fig. 2.70) vir multiplisiteitsbepaling. Soos gesien kan word is hierdie spektra baie kompleks en alhoewel tekens van onversadiging (by δ_{C} 117-140 in die ^{13}C -spektrum, Fig. 2.69) en die teenwoordigheid van sure (δ_{C} 176.5 in die ^{13}C -spektrum, Fig. 2.69) verkry is, was 'n sinvolle interpretasie nie moontlik nie. Die rede vir die kompleksiteit van die spektra is waarskynlik dat die ekstrak groot hoeveelhede van verbindings bevat wat so 'n lae vlugtigheid het dat hulle nie in die TIC verskyn nie.

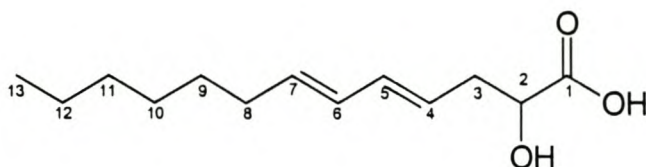
Daar kon geen verwysing uit die literatuur verkry word vir die vergelyking van die KMR-spektra van etiel-5-hidroksi-2,6-heptadiënoaat of 5-hidroksi-2,6-nonadiënoësuur met eksperimentele data nie. Vir die vergelyking van KMR-spektra met dié van moontlike strukture, moes teoretiese ^{13}C -KMR spektra met behulp van verskeie metodes gesimuleer word.

¹³C-KMR simulاسies

Verskeie ¹³C-KMR simulاسies is uitgevoer en die chemiese verskuiwings vergelyk met die eksperimentele resultate.

Aanvanklike simulاسies (noem Simulasie1) van verskeie onversadigde hidroksisure (strukture L1, L3, L5, L7, L9, L11) is met behulp van *ChemWindow*-sagteware⁴⁶ uitgevoer en die δ -waardes wat verkry is, word in Tabel 2.7 weergegee.





L11

Die ^{13}C -chemiese verskuiwings vir olefiniese koolstowwe van gesubstitueerde alkene kan ook met behulp van vergelyking 1 bereken word⁴⁷. Dit is vir die olefiniese koolstowwe van die gegewe strukture bereken en die resultate in Tabel 2.7 getabuleer:

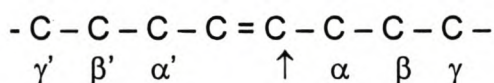
$$\delta_c(k) = 123,5 + \sum_i A_{ki}(R_i) + \sum_{i'} A_{ki'}(R_{i'}) + \text{korreksiet terme} \dots\dots\dots 1$$

$\delta_c(k)$ = chemiese verskuiwing van koolstof k .

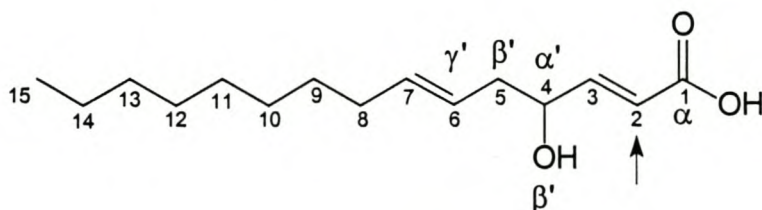
$A_{ki}(R_i)$ = Verskuiwings inkrimment vir koolstof k indien substituent R_i op koolstof i aangebring word.

$A_{ki'}(R_{i'})$ = Verskuiwings inkrimment vir koolstof k indien substituent $R_{i'}$ op koolstof i' aangebring word.

Vir die algemene geval kan die koolstofketting as volg beskou word. Die onderlinge posisies α , β en γ is aangedui:



Die berekening van die ^{13}C -chemiese verskuiwings vir C_2 en C_3 van struktuur L3 word hier as voorbeeld gegee (Tabel 2.6). Die berekeninge vir die chemiese verskuiwings (δ_c) van die ander olefiniese koolstowwe is soortgelyk.



L3

Tabel 2.6: Voorbeeld vir berekening van ^{13}C -chemiese verskuiwings (δ_{C}) van olefiniese koolstofatome C_2 en C_3 vir struktuur L3.

R_i & R_i' vir C_3	C_3	C_2	R_i & R_i' vir C_2
$\text{CH}_2=\text{CH}_2$	123.5	123.5	$\text{CH}_2=\text{CH}_2$
$\alpha' - \text{COOH}$	+9	+4	$\alpha - \text{COOH}$
$\alpha - \text{C}$	+10.6	-7.9	$\alpha' - \text{C}$
$\beta - \text{OH}$	+6	-1	$\beta' - \text{OH}$
$\beta - \text{C}$	+7.2	-1.8	$\beta' - \text{C}$
$\gamma - \text{C}$	-1.5	+1.5	$\gamma' - \text{C}$
Korreksierme $\alpha\alpha'$	0	0	Korreksierme $\alpha\alpha'$
$\delta_{\text{C}}(\text{C}_3)$	154.8	118.3	$\delta_{\text{C}}(\text{C}_2)$

Beter simulasies kon verkry word met behulp van die SPECINFO-stelsel⁴⁸ en resultate word in Tabel 2.7 gegee.

Tabel 2.7: Vergelyking tussen gesimuleerde en eksperimentele ^{13}C -chemiese verskuiwings (d.p.m.).

Struktuur L1	δ_{C}			
Koolstof	Simulasie ^{1a}	Bereken ^b	Eksperimenteel ^c	SPECINFO ^d
1	170.0	-	-	171.69
2	119.1	119.3	117.3	129.05
3	147.8	148.8	-	146.17
4	40.3	-	39.8	32.32
5	74.6	-	73.7	71.68
6	129.1	137.6	129.9	127.5
7	131.8	130.6	129.9	131.69
8	33.6	-	33.9	29.58
9	30.3	-	30.7	29.20
10	30.1	-	30.1	29.20
11	32.6	-	32.5	31.95
12	23.1	-	23.0	22.71
13	14.0	-	14.1	14.04

^a Gesimuleer met ChemWindow-sagteware.

^b Bereken volgens vergelyking 1.

^c Data uit ^{13}C -KMR spektrum Fig. 2.69 tentatief toegeken.

^d Gesimuleer met behulp van 'n internasionale databasis

Tabel 2.7: Vervolg.

Struktuur L3	δ_c			
Koolstof	Simulasie1	Bereken	Eksperimenteel	SPECINFO
1	170.0	-	-	170.38
2	119.1	118.3	117.3	122.17
3	147.8	154.8	-	144.32
4	74.3	-	73.7	54.61
5	40.6	-	39.6	34.65
6	129.1	131.6	129.9	132.53
7	131.8	131.6	129.9	127.86
8	33.3	-	33.9	28.71
9	30.3	-	30.7	29.20
10	30.1	-	30.1	29.20
11	32.6	-	32.5	31.95
12	23.1	-	23.0	22.71
13	14.0	-	14.1	14.04

Struktuur L5	δ_c			
Koolstof	Simulasie1	Bereken	Eksperimenteel	SPECINFO
1	170.0	-	-	170.71
2	120.9	119.3	117.3	119.15
3	146.7	148.8	-	145.45
4	128.0	131.6	129.9	131.68
5	133.6	131.6	-	141.39
6	41.0	-	-	34.49
7	72.0	-	72.2	71.42
8	38.0	-	37.0	36.31
9	24.2	-	24.3	24.95
10	30.3	-	30.1	29.07
11	32.5	-	32.5	31.95
12	23.1	-	23.0	22.71
13	14.0	-	14.1	14.04

Tabel 2.7: Vervolg.

Struktuur L7	δ_c			
	Simulasie1	Bereken	Eksperimenteel	SPECINFO
1	170.0	-	-	170.71
2	120.9	119.3	117.3	119.15
3	146.7	148.8	-	145.45
4	128.0	130.6	129.9	130.82
5	133.6	137.6	-	138.82
6	75.0	-	-	71.71
7	38.0	-	72.0	37.10
8	24.2	-	38.2	25.34
9	30.7	-	24.3	28.77
10	30.0	-	30.1	29.42
11	32.5	-	32.5	31.95
12	23.1	-	23.0	22.71
13	14.0	-	14.1	14.04

Struktuur L9	δ_c			
	Simulasie1	Bereken	Eksperimenteel	SPECINFO
1	177.0	-	176.5	175.85
2	43.5	-	43.4	38.84
3	69.8	-	-	69.45
4	131.0	137.6	129.9	127.64
5	128.1	130.6	129.9	127.72
6	128.0	131.6	129.9	130.71
7	133.6	131.6	129.9	132.47
8	33.4	-	33.7	30.33
9	30.4	-	30.7	29.20
10	30.1	-	30.1	29.20
11	32.6	-	32.5	31.95
12	23.1	-	23.0	22.71
13	14.0	-	14.1	14.04

Tabel 2.7: Vervolg.

Struktuur L11	δ_c			
Koolstof	Simulasie1	Bereken	Eksperimenteel	SPECINFO
1	177.0	-	176.5	176.45
2	81.2	-	82.1	70.81
3	35.8	-	35.2	32.40
4	131.0	131.6	129.9	130.26
5	128.1	131.6	129.9	129.93
6	128.0	131.6	129.9	127.31
7	133.6	131.6	129.9	132.47
8	33.4	-	33.7	30.33
9	30.4	-	30.7	29.20
10	30.1	-	30.1	29.20
11	32.6	-	32.5	31.95
12	23.1	-	23.0	22.71
13	14.0	-	14.1	14.04

Opsommend kan die resultate in Tabel 2.7 as volg beskou word. Die waardes wat in die tweede kolom voorkom is verkry vanaf Simulasie1 wat vir hierdie strukture uitgevoer is. In kolom 3 word slegs vier waardes vir elke verbinding weergegee, aangesien vergelyking 1 slegs geld vir olefiniese koolstofatome. Eksperimentele waardes is verkry vanaf die ^{13}C -KMR spektrum van die suni se preorbitale afskeiding (Fig. 2.69). Die eksperimentele waardes is uitgekies na aanleiding van vergelyking hiervan met waardes verkry uit Simulasie1 (*ChemWindow*-simulasie) en dit verskil in sommige gevalle aansienlik van die waardes verkry met behulp van die SPECINFO-simulasie. Dit is nie moontlik om 'n aanvaarbare vergelyking tussen die gesimuleerde en eksperimentele ^{13}C -KMR spektra te kry nie en vereenvoudiging van die ^{13}C -KMR spektrum sou noodsaaklik wees vir verdere analise.

Isolering deur middel van ekstraksie met 'n basis

Die komplekse KMR spektra wat aanvanklik verkry is, het aanleiding gegee daartoe dat 'n skeidingsmetode gevind moes word om 'n eenvoudiger mengsel en dus 'n eenvoudiger spektrum te verkry. As eerste skeidingsmetode is gepoog om die sure van die ander tipe verbindings, veral cholesterol, te skei. Dit is gedoen deur die sure om te sit in soute, wat wateroplosbaar is, en die soute met water uit die CDCl_3 -oplossing te ekstraheer. 'n GC-MS-analise van die CDCl_3 -laag na die ekstraksie, toon

duidelik dat die twee komponente met behulp van hierdie metode uit die ekstrak verwyder is (Fig. 2.71).

Hierna is die waterlaag aangesuur en die sure vir ^{13}C -KMR analise met CDCl_3 uit die waterlaag geëkstraheer (Suurfraksie A).

Die ^{13}C -KMR spektrum van Suurfraksie A bevat egter geen resonansies wat aan olefiniese koolstofatome toegeskryf kan word nie (Fig. 2.72). 'n Moontlike verklaring op hierdie stadium sou kon wees dat daar versadigde langketting vetsure, wat nie andersins waargeneem is nie, in die afskeiding teenwoordig is wat die olefiniese pieke onderdruk. Aan die ander kant bestaan die moontlikheid dat die verbinding onder bespreking so onstabiel is, dat dit kon degradeer tydens die ekstraksie van die sure of dat die verbinding nie soos vermoed, dubbelbindings bevat nie. Van die ^{13}C -KMR-opname van Suurfraksie A (Fig. 2.72) kon op hierdie stadium dus niks afgelei word nie. Op 'n later stadium (sien hidrogering en GC-MS-analises van Fraksie 3 by HPLC) is egter bewys dat komponente 5009 en 5642 wel versadigde verbindings is en dat bogenoemde ekstraksie tog moontlik suksesvol was. Dit sou dan ook impliseer dat die verbindings onder bespreking oplos in 'n basis en dus 'n suur- of laktoonfunksie moet bevat.

'n GC-MS-analise van Suurfraksie A (Fig. 2.73-2.75) toon komponente met ione by m/z 153 en 135, soos verkry in 'n analise van die preorbitale afskeiding van die suni-ooi (komponente 5009 en 5642 in Fig. 2.4). Die relatiewe konsentrasies van die onbekende komponente 5009 en 5642 (komponente 2842 en 3157 in Fig. 2.73) in vergelyking met die res van die verbindings in die mengsel na die skeiding, is effens verskillend. Dit het die vermoede laat ontstaan dat gedeeltelike degradasie moontlik plaasgevind het.

Hoëdruk Vloeistofchromatografie (HPLC)

As volgende skeidingsmetode is van hoëdruk vloeistofchromatografie (HPLC) gebruik gemaak. 'n Omgekeerde fase C₁₈-kolom is gebruik met metanol/water as elueermiddel. Om die skeidingskondisies te bepaal, is gebruik gemaak van twee mono-onversadigde sure, naamlik palmitien- en oleïensuur ((Z)-9-heksadekenoësuur en (Z)-9-oktadekenoësuur), wat deur die PDA-detektor (Photo Diode Array) waargeneem word by 'n golflengte van ongeveer 200 nm. Inligting in verband met die skeidingskondisies vir vetsure is uit die literatuur verkry⁴⁹ en bevredigende skeiding van palmitien- en oleïensuur kon verkry word met 'n lineêre gradiënt van 85% metanol in water (wat 0.05% asynsuur bevat) tot 100% metanol (bevattende 0.05% asynsuur) oor 'n tydperk van 40 minute. 'n Detektorgolflengte van 205 nm is gebruik. By hierdie kondisies is twee duidelike pieke in die vloeistofchromatogram (Fig. 2.76) by retensietye van 8.142 en 12.342 minute verkry. Die betrokke verbindings is opgevang en met behulp van GC-analises is bevestig dat hulle palmitien- en oleïensuur is. Hierdie twee sure se retensietye verskil van dié in die literatuur⁴⁹ aangesien by 25°C gewerk is in vergelyking met die literatuurwaardes wat by 22°C verkry is. Die retensietye is dus van so 'n aard dat die pieke geskei kon word. Die dooie volume van die vloeistofchromatograaf, dit wil sê die tydsduur vandat 'n komponent deur die detektor waargeneem word totdat dit opgevang kan word, is met behulp van kristalviolet bepaal. Met die betrokke instrument is die dooie volume so klein dat fraksies opgevang kon word sodra 'n komponent deur die detektor waargeneem is.

Die vloeistofchromatogram van Suurfraksie A (Fig. 2.77) is verkry by bogenoemde kondisies. Die pieke het egter by 'n baie lae retensietyd geëlueer en daar is vermoed dat die gradiënt te steil is. 'n Alternatiewe gradiënt van 60% metanol in water (wat beide 0.05% asynsuur bevat) tot 100% metanol (0.05% asynsuur) oor 'n tydperk van 20 minute, gevolg deur 100% metanol (0.05% asynsuur) vir 5 minute, het beter resultate gelewer. 'n Redelik duidelike vloeistofchromatogram (Fig. 2.78) is by hierdie kondisies verkry en Fraksies 3 en 5 wat die komponente bevat het waarin belang gestel is, is opgevang by retensietye van ongeveer 5-7 minute en 7.5-9.2 minute (kyk Fig. 2.79) onderskeidelik. Die skeidingsproses is vyf maal herhaal tot al die beskikbare materiaal in Suurfraksie A opgebruik is. Fraksie 3 bestaan uit al die fraksies wat opgevang is by 'n retensietyd van 5-7 minute in die onderskeie eksperimente, terwyl Fraksie 5 bestaan uit al die fraksies wat by 7.5-9.2 minute opgevang is. Buiten Suurfraksie A, is die

skeiding van 'n metanol-ekstrak van die preorbitale afskeiding van die suni-ooi ook met behulp van HPLC aangepak (kyk Fig. 2.79). Verdere hoeveelhede van Fraksies 3 en 5 is by naasteby dieselfde retensietye as hierbo opgevang. Aangesien die konsentrasie van 'n enkele opgevangde fraksie baie laag is en nie voldoende sou wees vir GC-MS of KMR-analise nie, is fraksies weereens gekombineer soos hierbo beskryf. GC-MS analyses van Fraksies 3 en 5 (Fig. 2.80 en 2.81) het bevestig dat hulle onder andere die onbekende verbindings komponente 5009 en 5642 bevat het, alhoewel die twee komponente nie heeltemal suiwer geïsoleer is nie. Die doel van die HPLC-skeiding was egter nie om die twee onbekende verbindings noodwendig absoluut suiwer te isoleer nie aangesien sodanige suiwering moontlik so min suiwer materiaal sou lewer, dat KMR-analise onmoontlik sou wees. Die primêre doelstelling was dus die vereenvoudiging van die chemiese matriks waarin die komponente voorgekom het ten einde die interpretasie van KMR- en ander moontlike analyses te vereenvoudig. Die gekombineerde Fraksies 3 en 5 is dus ingedamp en met CDCl_3 verdun vir KMR-analise.

KMR-analise van Fraksies 3 en 5 (Tabel 2.8 en Fig. 2.82 en 2.83) wat op die Varian 300 VXR spektrometer van die Universiteit van Stellenbosch uitgevoer is, het getoon dat baie min onversadiging teenwoordig is en die gevolgtrekking is gemaak dat die skeiding moontlik oneffektief was. Na hidrogenering van 'n gedeelte van Fraksie 3 het 'n GC-MS-analise nie veel verskil van die GC-MS analise van Fraksie 3 voor hidrogenering getoon nie (Fig. 2.84-2.87). Die aanvanklike vermoede dat komponente 5009 en 5642 onversadigde hidroksisure is, was dus verkeerd en die moontlikheid van sikliese verbindings moes oorweeg word. Die skeiding was dus suksesvol en die geïsoleerde materiaal sou dus vir KMR analise gebruik kon word.

Tabel 2.8: ^{13}C -Chemiese verskuiwings (d.p.m.) vir Fraksies 3 en 5.

Fraksie 3		Fraksie 5	
δ_{C}	Intensiteit	δ_{C}	Intensiteit
-		177.6	6.807
82.10	53.685	82.09	82.573
78.93	52.785	78.91	80.218
74.23	57.684	74.24	82.495
35.14	64.494	35.11	92.548
-	-	34.00	14.158
33.05	63.076	33.35	105.149
32.47	75.744	32.45	93.087
-	-	31.83	92.159
28.49	71.534	29.41	103.544
27.81	79.359	28.48	93.597
25.72	57.890	25.69	73.323
24.87	26.986	25.59	94.387
22.81	76.884	24.80	35.577
22.67	25.314	22.64	100.854
14.05	70.232	14.10	81.938

HEROORWEGING VAN BESKIKBARE EN NUWE DATA

Hoë Resolusie Massaspektrometrie (HRMS)

Volgens CI data (kyk vroeër) en die hoë resolusie massaspektrum (Fig. 2.88) van die ongehidrogeneerde gedeelte van Fraksie 3 (verteenwoordigend van komponent 5009 in Fig. 2.4), is die molekulêre massa van komponent 5009 240 Da en die molekulêre formule kan dus $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_3$ wees. Hoë resolusie data het ook die elementsamestelling van feitlik al die ione in die massaspektrum van die komponent gelewer. Die betrokke data word in Tabel 2.9 gegee. Aangesien die verbinding geen dubbelbindings bevat nie (soos voorheen bespreek), moet dit twee ringe bevat om die korrekte molekulêre massa te gee. Van die afwesigheid van prominente ione by m/z 70 en 84 is afgelei dat die verbinding nie onderskeidelik 'n ongekondenseerde furaan- of piraanring bevat nie. Die spektrum het ook nie ione by m/z 85 of 99 nie en dus is daar waarskynlik ook nie 'n ongekondenseerde γ -laktoon- of δ -laktoonring in die verbinding aanwesig nie.

Tabel 2.9: HRMS-resultate van Fraksie 3.

Massa	%	Bereken	Fout (dpm)	Formule
55.0560	23.22	55.0548	22.2	C ₄ H ₇
57.0716	9.22	57.0704	21.1	C ₄ H ₉
67.0549	17.08	67.0548	2.3	C ₅ H ₇
69.0706	14.63	69.0704	3.1	C ₅ H ₉
71.0495	10.35	71.0497	2.8	C ₄ H ₇ O
83.0503	9.44	83.0497	6.9	C ₅ H ₇ O
93.0700	17.69	93.0704	4.7	C ₇ H ₉
97.0662	7.03	97.0653	8.7	C ₆ H ₉ O
107.0473	1.97	107.0497	22.1	C ₇ H ₇ O
107.0869	8.65	107.0861	7.2	C ₈ H ₁₁
111.0803	29.39	111.0810	5.9	C ₇ H ₁₁ O
125.0966	12.10	125.9664	0.1	C ₉ H ₁₃ O
135.0820	36.41	135.0810	7.7	C ₉ H ₁₁ O
153.0910	88.92	153.0916	3.7	C ₉ H ₁₃ O ₂
171.1030	18.70	171.1021	5.3	C ₉ H ₁₅ O ₃
183.1114	6.93	183.1021	50.6	C ₁₀ H ₁₅ O ₃
240.1721	0.53	240.1726	1.9	C ₁₄ H ₂₄ O ₃

As 'n belangrike uitgangspunt vir verdere interpretasie van die KMR data is aanvaar dat hierdie verbinding, net soos al die ander verbindings in die afseiding, 'n onvertakte koolstofskelet het.

KMR-spektrometrie en -simulasies

¹³C-KMR en ¹H-KMR spektra van Fraksies 3 en 5 is met behulp van die Varian 300 VXR spektrometer opgeneem (¹³C-KMR spektra in Fig. 2.82 en 2.83, ¹H-KMR spektra word nie hier gegee nie) en soos reeds vermeld is die data in Tabel 2.8 vervat. 'n APT-analise (Fig. 2.89) is ook met behulp van die VXR 300 spektrometer op Fraksie 5 uitgevoer om die waterstofsubstitusie van die koolstofatome te bepaal.

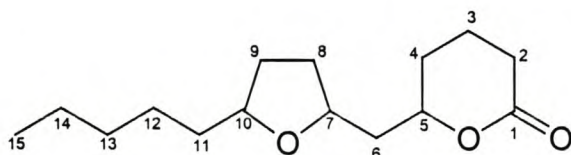
Die resonansie by δ_c 177.6 in die ¹³C-KMR spektrum van Fraksie 5 het 'n baie lae intensiteit en 'n soortgelyke resonansie is afwesig in die KMR spektrum van Fraksie 3. Die resonansie by δ_c 177.6 in die ¹³C-KMR spektrum van Fraksie 5 kan vermoedelik aan 'n karboniel-koolstofatoom toegeskryf word. Die konsentrasie van Fraksie 3 was laer as dié van Fraksie 5 en die ¹³C-KMR spektrum daarvan gevolglik swakker. Die feit dat 'n karbonielpiek nie in die ¹³C-KMR spektrum van Fraksie 3 voorkom nie, sluit nie

die moontlikheid van 'n karboniel uit nie, omrede die karbonielresonansie normaalweg swakker as die ander resonansies is en as gevolg van die lae konsentrasie van die verbinding moontlik nie waargeneem kan word nie.

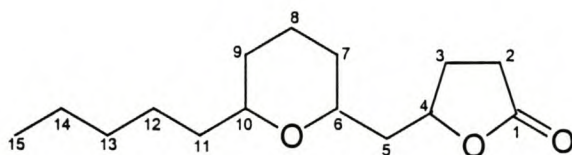
Van Fraksie 5 is ook ^{13}C -, APT- en ^1H -KMR spektra op die INOVA 600 by die Universiteit van Stellenbosch opgeneem (Fig. 2.90-2.93). Resultate was in ooreenstemming met dié wat met behulp van die VXR 300 verkry is.

Die multiplisiteit van die koolstofatome is bevestig met 'n DEPT-analise (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) (Fig. 2.94). Onduidelikheid ten opsigte van die resonansie by 34.00 dpm is ook opgeklaar met behulp van die DEPT-analise. Dit het getoon dat hierdie resonansie 'n CH_2 -groep verteenwoordig en nie 'n kwaternêre koolstofatoom nie.

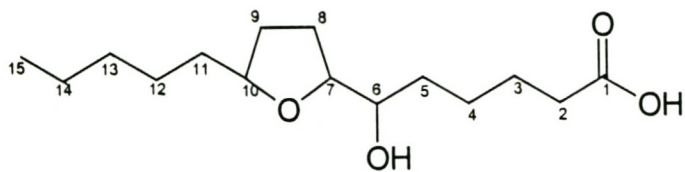
In hierdie stadium is die ^{13}C -data met data in die SPECINFO-databasis vergelyk. Verskeie brokstukke kon geïdentifiseer word en vervolgens is strukture A tot H voorgestel en hul ^{13}C -KMR spektra met behulp van SPECINFO gesimuleer (Tabel 2.10), hoewel strukture C tot H volgens die massaspektrometriese data nie in aanmerking geneem behoort te gewees het nie (getal ringe of getal suurstofatome nie korrek nie).



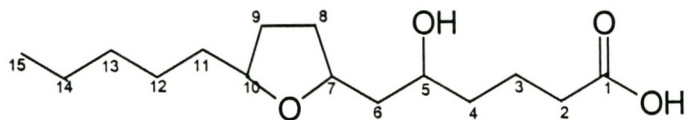
A



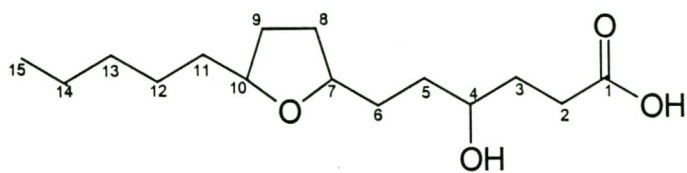
B



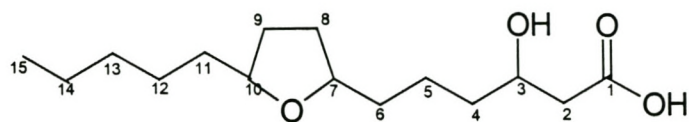
C



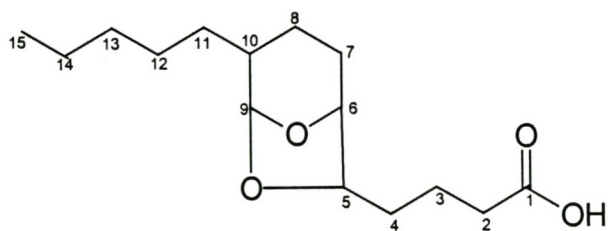
D



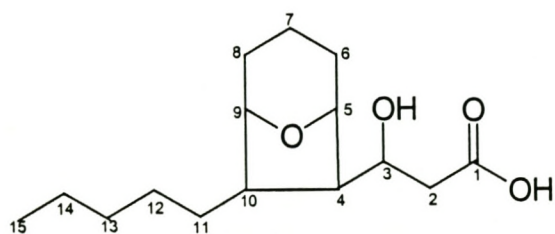
E



F



G



H

Tabel 2.10: Gesimuleerde ^{13}C -chemiese verskuiwings (d.p.m.) vir strukture A-H.

^{13}C	δ			
Koolstof	A	B	C	D
1	171.93	176.86	178.29	178.29
2	30.87	28.67	34.28	35.12
3	18.50	30.36	24.13	21.10
4	30.11	70.63	24.99	34.89
5	75.85	41.24	33.33	68.01
6	41.24	32.30	74.03	35.61
7	74.30	68.84	81.58	72.95
8	31.53	20.05	28.25	31.53
9	31.51	34.40	31.51	31.51
10	79.59	76.99	79.59	79.59
11	31.74	30.48	31.74	31.74
12	24.12	24.12	24.12	24.12
13	31.41	31.41	31.41	31.41
14	22.71	22.71	22.71	22.71
15	14.04	14.04	14.04	14.04

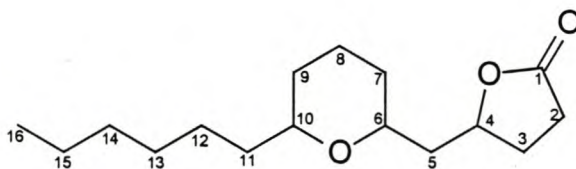
^{13}C	δ			
Koolstof	E	F	G	H
1	177.00	175.70	178.29	177.02
2	30.26	42.16	35.12	37.61
3	31.39	68.02	21.10	70.08
4	71.09	36.53	27.68	53.31
5	37.00	25.11	78.64	87.83
6	30.24	31.74	78.22	32.95
7	79.59	79.59	24.19	21.10
8	31.51	31.51	27.60	27.48
9	31.51	31.51	106.45	69.48
10	79.59	79.59	39.75	43.97
11	31.74	31.74	27.74	28.60
12	24.12	24.12	28.87	28.30
13	31.41	31.41	30.76	30.76
14	22.71	22.71	22.71	22.71
15	14.04	14.04	14.04	14.04

Verskeie tweedimensionele KMR eksperimente is met Fraksie 5 uitgevoer op die INOVA 600 in 'n poging om meer duidelikheid te kry oor die struktuur. Vir die bepaling van kort- en langafstand korrelasies tussen protone, is 2D COSY-eksperimente

(COrelated Spectroscopy) (Fig. 2.95-2.97) uitgevoer. Die data verkry uit die COSY spektra is in Tabel 2.15 (kyk later) uiteengesit.

Proton-koolstof toekennings is gemaak deur gebruik te maak van korrelasie oor een binding in die 2D HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) spektrum (Fig. 2.98) en korrelasies oor twee en drie bindings in die 2D HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) spektra (Fig. 2.99). Toekennings van chemiese verskuiwings (δ_c) en korrelasies word in Tabel 2.14 (kyk later) gegee.

'n Spesifieke struktuur kon nog steeds nie uit die bogenoemde spektrometriese data afgelei word nie. Die ^{13}C -data is gevolglik op 'n databasis van ACD/ILab Web⁵⁰ (*Advanced Chemical Development*) ingevoer en verskeie tipiese strukture is verkry. Daar is veral belanggestel in 'n struktuur wat as resultaat van bogenoemde soektog na vore gekom het en tipies soortgelyk is aan strukture A en B wat vroeër gesimuleer is. Die struktuur en ^{13}C -data word hieronder en in Tabel 2.11 gegee.

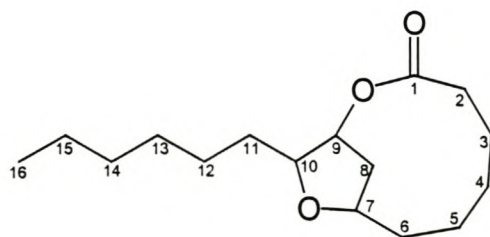


Na aanleiding van die resultate van hierdie soektog, vorige simulaties en die onderskeie KMR eksperimente, is strukture PA-PI voorgestel en ^{13}C - en ^1H -chemiese verskuiwings is vir hierdie strukture gesimuleer met behulp van ACD-sagteware. Van die voorgestelde strukture (PC-PG) moes weer volgens massaspektrometriese data nie in aggeneem word nie. Dit is egter gesimuleer om 'n idee te kry van watter invloed verskillende chemiese omgewings op tipiese koolstowwe se chemiese verskuiwings het. Resultate volg in Tabel 2.12.

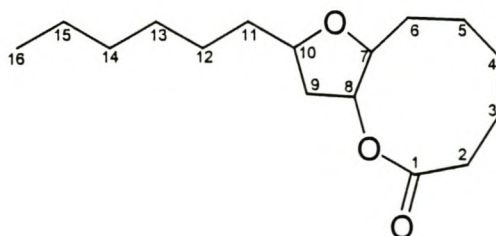
Tabel 2.11: Voorstelling van ^{13}C -chemiese verskuiwings (d.p.m.) vir die verbinding hierbo. Verkry uit soektog van ACD-databasis.

Koolstof	δ_{C}	Standaard Afwyking in δ_{C}^* (d.p.m.)
1	176.70	0.00
2	28.10	0.00
3	27.60	0.00
4	79.10	0.00
5	29.97	7.73
6	75.32	12.00
7	33.40	1.96
8	22.03	2.60
9	32.88	2.02
10	75.58	12.00
11	33.13	6.40
12	26.07	2.41
13	29.70	3.58
14	33.54	2.43
15	22.52	1.28
16	13.98	0.23

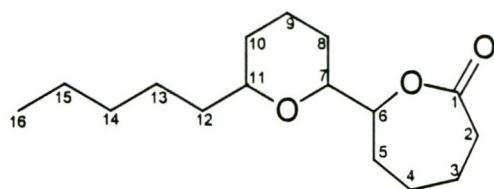
* Hierdie afwyking hang af van die aantal verbindings met die betrokke tipe chemiese omgewing wat in die databasis beskikbaar is. n Klein fout kan dus ook beteken dat daar 'n beperkte getal verbindings van die betrokke verbindingstipe in die databasis opgeneem is.



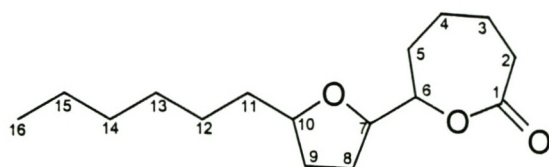
PA



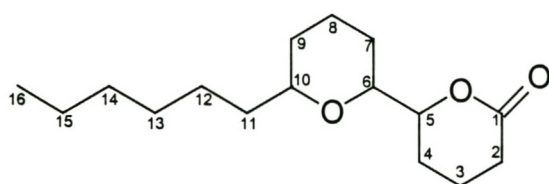
PB



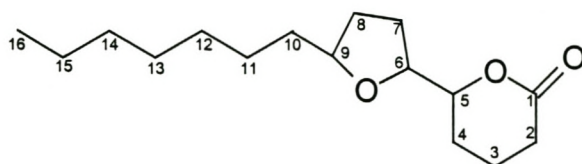
PC



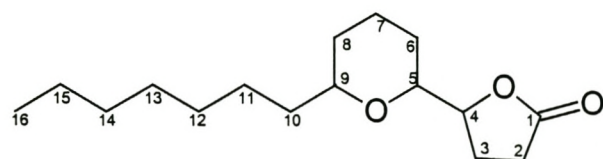
PD



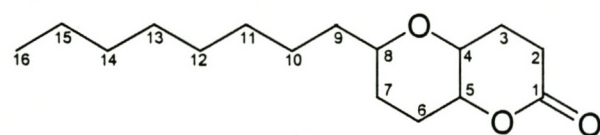
PE



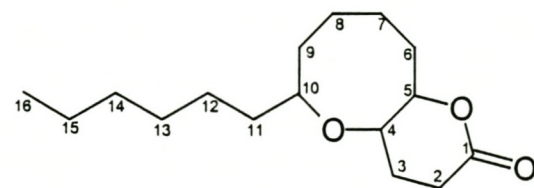
PF



PG



PH



PI

Tabel 2.12: Gesimuleerde ^{13}C - en ^1H -chemiese verskuiwings (d.p.m) vir strukture PA tot PI.

Strukture	PA		PB		
Koolstof	δ_{C}	δ_{H}	Koolstof	δ_{C}	δ_{H}
1	177.50	-	1	175.74	-
2	37.07	2.55	2	34.50	2.43
3	26.44	1.13	3	25.76	1.66
4	29.22	1.29	4	30.14	1.34
5	24.55	1.63	5	23.21	1.63
6	37.71	1.57	6	28.14	1.27
7	75.03	4.59	7	82.27	3.97
8	36.50	2.16, 2.40	8	79.49	4.98
9	77.61	4.98	9	33.48	1.51, 1.27
10	80.06	3.80	10	78.78	4.01
11	28.86	1.51	11	36.85	2.17, 2.38
12	25.28	1.50	12	25.72	1.51
13	31.24	1.50, 1.70	13	30.38	1.74
14	31.80	1.28	14	31.71	1.28
15	22.62	1.31	15	22.55	1.31
16	14.07	0.88	16	14.07	0.88

Strukture	PC		PD		
Koolstof	δ_{C}	δ_{H}	Koolstof	δ_{C}	δ_{H}
1	172.59	-	1	172.59	-
2	34.01	2.34	2	34.01	2.34, 2.63
3	25.11	1.62, 1.72	3	26.03	1.46
4	30.24	1.91, 2.16	4	30.24	1.91, 2.16
5	28.29	1.23, 2.03	5	27.67	1.70, 1.62
6	82.74	3.40	6	81.12	3.97
7	77.46	3.41	7	82.15	3.82
8	25.33	1.35	8	22.55	1.31
9	22.27	1.40	9	30.14	1.34
10	31.77	1.40	10	75.35	5.59
11	77.41	5.61	11	41.43	1.63, 1.77
12	34.32	1.52, 1.28	12	25.11	1.62, 1.72
13	23.99	1.60, 1.70	13	31.71	1.33
14	33.28	1.62, 1.77	14	33.49	1.48, 1.68
15	22.37	1.46, 1.54	15	23.99	1.60, 1.70
16	14.02	0.88	16	14.07	0.88

Tabel 2.12: Vervolg.

Strukture	PE		PF		
Koolstof	δ_C	δ_H	Koolstof	δ_C	δ_H
1	171.84	-	1	171.84	-
2	31.71	1.33	2	33.38	1.73, 1.53
3	23.13	1.57, 1.65	3	25.79	1.43
4	28.44	1.15, 1.95	4	27.82	1.68, 1.76
5	83.20	3.52	5	81.58	3.97
6	77.74	3.50	6	80.29	3.44
7	27.26	1.38, 2.18	7	18.93	1.82, 1.90
8	18.93	1.82, 1.90	8	29.16	1.29
9	33.06	1.70, 1.86	9	75.14	4.74
10	77.19	4.70	10	42.19	1.53
11	34.08	1.49, 1.25	11	27.26	1.38, 2.18
12	26.03	1.46	12	31.24	2.41, 2.49
13	30.14	1.34	13	30.43	1.28
14	31.24	2.41, 2.49	14	31.76	1.29
15	22.55	1.31	15	22.72	1.31
16	14.07	0.88	16	14.07	0.88

Strukture	PG		PH		
Koolstof	δ_C	δ_H	Koolstof	δ_C	δ_H
1	179.23	-	1	172.06	-
2	28.83	2.40, 2.50	2	27.02	2.62, 2.57
3	26.16	1.94, 1.91	3	27.15	2.27, 1.98
4	81.87	4.12	4	80.65	3.74
5	81.14	3.56	5	80.36	4.52
6	28.44	1.15, 1.95	6	27.37	2.29, 1.57
7	23.13	1.57, 1.65	7	26.79	1.47, 1.83
8	33.06	1.70, 1.86	8	77.99	3.43
9	76.98	3.58	9	33.76	1.27, 1.51
10	33.97	1.50, 1.26	10	25.68	1.44
11	25.79	1.43	11	30.66	1.29
12	30.43	1.28	12	29.61	1.29
13	29.16	1.29	13	29.29	1.29
14	31.76	1.29	14	31.98	1.29
15	22.72	1.31	15	22.72	1.31
16	14.02	0.88	16	14.07	0.88

Tabel 2.12: Vervolg.

Struktuur	PI	
Koolstof	δ_C	δ_H
1	172.05	-
2	27.02	2.57, 2.62
3	27.74	1.94, 2.23
4	82.15	3.64
5	79.98	4.48
6	30.24	2.06
7	25.37	1.42
8	25.49	1.47
9	32.82	1.38
10	82.14	3.62
11	34.69	1.49, 1.25
12	26.03	1.46
13	30.14	1.34
14	31.24	2.41, 2.49
15	22.55	1.31
16	14.07	0.88

Alhoewel daar by sommige strukture goeie ooreenstemming was tussen sekere koolstofatome se gesimuleerde en eksperimentele data, was dit steeds nie goed genoeg om een van hulle as moontlik korrek te aanvaar nie. Die ^{13}C - en ^1H -chemiese verskuiwings van PG het die beste ooreenstemming met eksperimentele data getoon, maar daar was steeds 'n paar onduidelikhede en verder is hierdie struktuur nie 'n moontlikheid volgens die massaspektrometriese data nie.

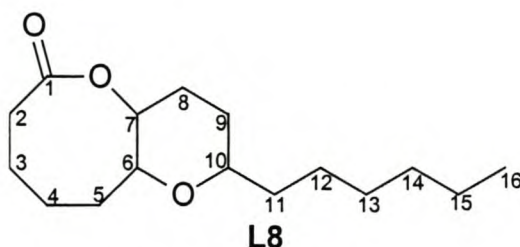
Addisionele spektrometriese data was dus nodig om uitsluitel oor die struktuur te kry. Die tegniek van 1D TOCSY (TOtal Correlation Spectroscopy) het die vermoë om spinstelsels te isoleer en so die inligting aangaande korrelasies binne spinsisteme te verkry. Op hierdie wyse kan komplekse ^1H -spektra vereenvoudig word en meer sinvol geïnterpreteer word. Uit die 1D TOCSY spektra (Fig. 2.100-2.111) kon die 1D TOCSY korrelasies maklik afgelei word en word in Tabel 2.15 gegee.

In Tabele 2.14 en 2.15 is al die beskikbare spektrometriese data soos die ^{13}C -chemiese verskuiwings, multiplisiteite (DEPT) en proton-koolstof toekennings $^1J_{\text{CH}}$ (HSQC) vervat. Die integrale van die protone is, waar onduidelik, met behulp van ^1H -spinstelsel karakterisering (1D TOCSY) asook met behulp van die multiplisiteite van die koolstofatome opgeklaar.

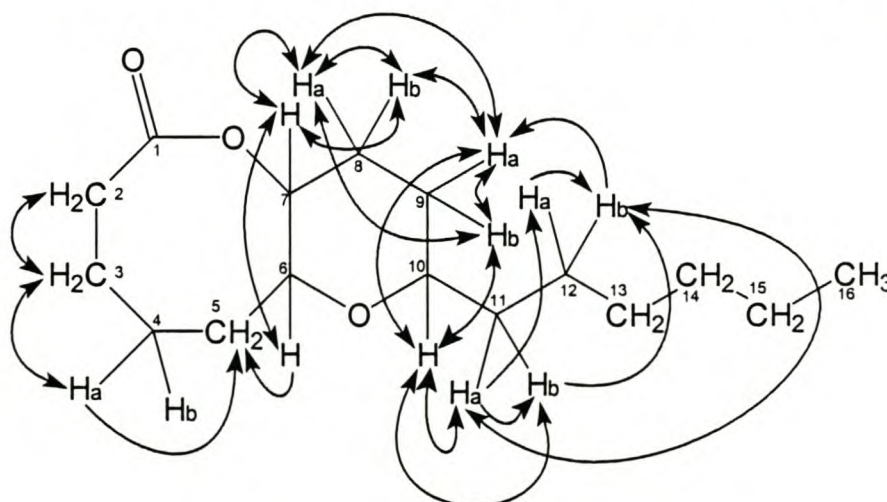
Volgens die koolstofmultiplisiteite kan gesien word dat daar 'n kwartet is, elf triplete, 'n karboniel (singulet) en drie doebllette. Van die chemiese verskuiwings van die doebllette kan afgelei word dat hulle al drie suurstofdraend is. Die enigste plek waar vertakkings in die koolstofketting moontlik sou wees sou by die singulet of doebllette wees en daar kan dus afgelei word dat die molekule 'n liniêre koolstofketting bevat met 'n metielterminus en 'n karboksielsuuraafgeleide terminus.

Die HMBC $^2J_{CH}$ - en $^3J_{CH}$ -inligting word gebruik om die konnektiwiteit langs die koolstofskelet te verkry en die HSQC $^1J_{CH}$ inligting word gebruik om koolstowwe met hul waterstofatome te assosieer.

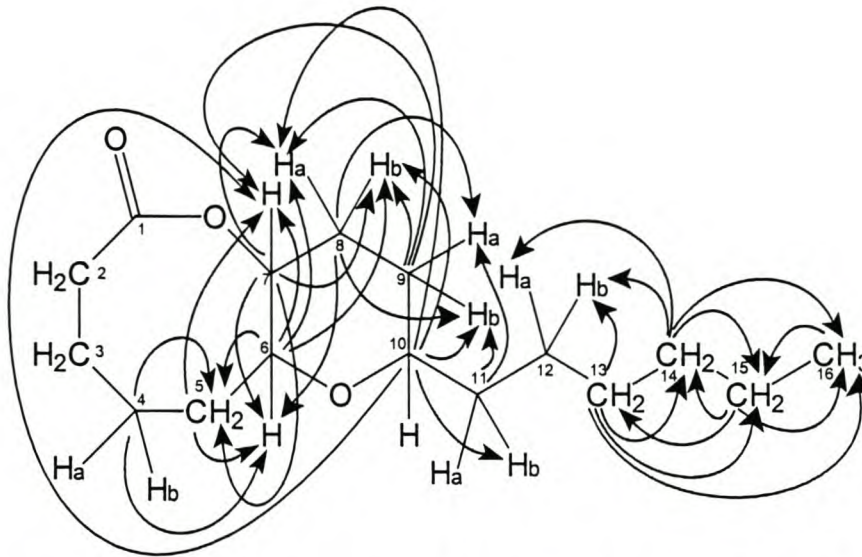
Na noukeurige oorweging van alle beskikbare spektrometriese data (DEPT, 2D COSY, 2D HSQC, 2D HMBC en 1D TOCSY) is die struktuur L8 as werksipotese voorgestel.



In die onderstaande diagramme kan gesien word hoe die 1H - 1H korrelasies (met behulp van COSY), asook die 1H - ^{13}C korrelasies oor twee of drie bindings toegeken is.



'n Skematiese voorstelling van die 1H - 1H korrelasies in die 2D COSY KMR-spektrum.



'n Skematiese voorstelling van die ^1H - ^{13}C korrelasies in die 2D HMBC KMR-analise.

Toekenning van die metielkoolstof as C-16 by δ_c 14.10 is voor die hand liggend. Die ^1H -spektrum van Fraksie 5 vertoon 'n triplet by δ_H 0.88 wat vir 3 protone integreer en dit kan dus aan 'n metielgroep toegeskryf word. Die koolstofatoom wat met hierdie protone korreleer kom as 'n kwartet (DEPT) voor by δ_c 14.10 en bevestig dus ook dat hierdie 'n metielkoolstof is. In die HMBC koppel die metielkoolstof (C-16) met protone by δ_H 1.29 wat ooreenstem met 'n koolstof by δ_c 22.64 (HSQC). Die chemiese verskuiwings δ_c 22.64 en δ_H 1.29 is dus aan C-15 en H-15 onderskeidelik toegeken. Die toekenning van C-14 en C-13 was redelik vanselfsprekend. Korrelasies van C-15 in die HMBC analises met protone by δ_H 1.28 het die twee koolstofatome by δ_c 31.83 en 29.42 uitgewys. Na vergelyking van hierdie ^{13}C -chemiese verskuiwings met dié van voorafgaande simulaties, het dit duidelik geblyk dat C-14 by δ_c 31.83 en C-13 by δ_c 29.42 voorkom en hul ooreenstemmende protone (H-14 en H-13) by δ_H 1.28. Die HMBC en 1D TOCSY analises bevestig dan ook hierdie toekenning (kyk Tabela 2.14 en 2.15).

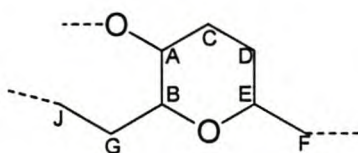
Verder het die HMBC analise 'n korrelasie getoon tussen C-13 en proton of protone wat resoneer by δ_H 1.37. Uit die HSQC analise kan gesien word dat twee protone by δ_H 1.37 korreleer met 'n koolstof by δ_c 33.35, terwyl een proton by δ_H 1.37 met 'n koolstof by δ_c 25.59 korreleer, wat op sy beurt ook met 'n proton by δ_H 1.51 korreleer. Korrelasie tussen C-14 en protone by δ_H 1.37 en 1.51 (HMBC) dui dus daarop dat δ_c

25.59 aan C-12 en δ_H 1.51 en 1.37 aan H-12a en H12b respektiewelik toegeken kan word. Hierdie toekenning is ook deur 1D TOCSY korrelasies bevestig. Daar kom geen langafstand korrelasies tussen C-12 en ander protone in die HMBC analise voor nie en daar is besluit om voort te gaan met toekennings van die ander punt van die koolstofketting.

Soos reeds genoem is die koolstofskelet onvertak met terminale metiel en 'n suuraafgeleide terminus. Die karboniel by δ_C 177.6 kan dus aan C-1 toegeken word. Geen verdere korrelasies met die karboniel kan waargeneem word nie. Die koolstofatoom by δ_C 34.00 met protone by δ 2.35 kom egter voor as 'n verbrede triplet in die proton spektrum en korreleer met twee protone. Vanuit vorige simulaties kan gesien word dat hierdie tipe chemiese verskuiwings ideaal is vir 'n groep wat alfa tot die karboniel geleë is en δ_C 34.00 δ_H 2.35 is aan C-2 en H-2 onderskeidelik toegeken. In die HMBC analise kom daar geen korrelasies tussen C-2 en ander protone voor nie. Die COSY toon egter kortafstand koppeling tussen protone H-2 en protone by δ_H 1.66 en die 1D TOCSY analise vertoon verskeie korrelasies, waaronder protone by δ_H 1.66, 1.46 en 1.37 die prominentste is. Die protone by δ_H 1.66 korreleer met 'n koolstofatoom wat resoneer by δ_C 24.79. Uit die COSY analise korreleer die protone by δ_H 1.66 met protone by δ_H 2.35 en 1.46. Die 1D TOCSY analise bevestig ook hierdie korrelasies. Die resonansie by δ_C 24.79 met ekwivalente protone by δ_H 1.66 is aan C-3 en H-3 onderskeidelik toegeken. In hierdie stadium kon daar nie verdere uitsluitel verkry word nie omdat daar oorvleueling van die protonresonansies is.

Die koolstofatoom by δ_C 82.01 is ook duidelik suurstofdraend soos bevestig deur die laeveld verskuiwing (koolstofatoom A in onderstaande gedeeltelike struktuur). Die proton wat direk aan hierdie koolstofatoom gekoppel is kom as 'n duidelike kwartet by δ_H 3.78 voor en bevestig deur chemiese verskuiwing geminaliteit met 'n suurstof. Hierdie proton koppel dus met protone van 'n CH_2 - sowel as 'n CH-groep met 'n koppelingskonstante (3J) van ongeveer 7.2 Hz. Uit die COSY analise kom dit dan duidelik na vore dat die proton by δ_H 3.78 oor drie bindings koppel met protone by δ_H 3.38 (geminaal aan suurstof), 1.96 en 1.60. Dit is ook van die HSQC analise bekend dat die proton by δ_H 3.38 koppel met 'n koolstofatoom (B) by δ_C 74.24 (bevestig ook aanwesigheid van 'n suurstofatoom) en die protone by δ_H 1.96 en 1.60 koppel met 'n

koolstofatoom (C) by δ_C 28.47. Koolstofatoom A kom dus voor tussen die CH-groep, B, en CH₂-groep, C. In die HMBC analise korreleer koolstofatoom C met protone wat resoneer by δ_H 2.02 en 1.51. Beide hierdie protone koppel volgens die HSQC analise met 'n koolstofatoom by δ_C 32.45. Die korrelasies tussen die koolstof C en laasgenoemde twee protone word in die COSY en 1D TOCSY analyses bevestig. Die koolstofatoom by δ_C 32.45 kan dus as newestaande tot C beskou word en word voorlopig D genoem. D korreleer in die HMBC spektrum terug met protone by δ_H 1.96 en 1.60 wat die koppeling tussen D en C bevestig. In die COSY analise kom 'n addisionele koppeling met die proton by δ_H 3.91 (geminaal tot suurstof) by. Hierdie proton korreleer met die koolstofatoom wat ook 'n suurstofatoom dra en by δ_C 78.92 resoneer en hierdie CH-groep kan dus E genoem word. Die korrelasies in die HMBC analise tussen koolstofatoom E en die protone van D bevestig koppeling tussen E en D. Koppeling tussen E en die protone van C kom ook voor. Soos reeds genoem is al die CH-groepe suurstofbevattend. Volgens die HRMS data kom daar slegs drie suurstofatome in die verbinding voor. Van die 1D TOCSY is dit ook duidelik dat koolstofatome A, B, C, D en E deel vorm van 'n ringspinsisteem en daar moet dus 'n suurstof voorkom tussen B en E om 'n tetrahidopiraanring te vorm. Die ander suurstof moet noodgedwonge aan A gekoppel wees en terselfdertyd deel vorm van die karboksielsuurafgeleide funksie.



'n Skematiese voorstelling van die tetrahidopiraanbrokstuk met simbole A tot J, soos hierbo bespreek.

Daar kan dus gesien word dat 'n laktoonring gevorm moet word om aan die vereistes rakende die onvertakte koolstofskelet, karboksielsuurafgeleide terminus en HRMS data te voldoen. 'n Furaanring tussen A en E is uitgesluit deur die afwesigheid van fragmente in die HRMS wat daarmee sou ooreenstem.

Uit die COSY analise is addisionele kortafstand korrelasies tussen die proton by δ_H 3.91 en protone by δ_H 1.60 en 1.46 aangedui. Die laasgenoemde twee protone korreleer oor een binding met die koolstofatoom by δ_C 35.11 (HSQC) en is dus toegeken as die koolstofatoom F, wat by δ_C 35.11 voorkom en in die koolstofketting dus newestaande tot E, of anders gestel, alfa tot die piraanring geleë is.

In die HMBC analise van die koolstofatoom B, kom korrelasie met protone by δ_H 1.37 voor. Uit die HSQC analise is dit duidelik dat twee protone by δ_H 1.37 korreleer met 'n koolstofatoom by δ_C 33.35 en een proton korreleer met 'n koolstofatoom by δ_C 25.59. Vanuit die voorafgaande redenasie is die koolstofatoom by δ_C 25.59 reeds aan C-12 toegeken en kan aanvaar word dat die koolstofatoom B met die protone wat koppel met die koolstofatoom by δ_C 33.37, korreleer. Die koolstofatoom by δ_C 33.37 kan dus G genoem word en kom newestaande tot die piraanring voor. Die HMBC analise van G toon korrelasies met protone by 3.78 en 3.38, wat met koolstofatome A en B onderskeidelik gebind is en dus die plasing van G alfa tot die piraanring bevestig. Die koolstofatoom B toon ook 'n korrelasie met 'n proton by δ_H 1.46 en in die TOCSY analise korreleer protone by δ_H 1.37 met protone by δ_H 1.33. Uit die HSQC analise kan gesien word dat protone by δ_H 1.46 en 1.33 oor een binding koppel met 'n koolstofatoom wat by δ_C 25.69 resoneer. Hierdie koolstofatoom (J) is dus beta met betrekking tot die piraanring in die gedeeltelike struktuur hierbo. Uit die 1D TOCSY analise is dit duidelik dat 'n proton by δ_H 1.46 korreleer met protone wat resoneer by δ_H 1.66 (H-3) en 2.35 (H-2). Die koolstofatoom by J is C-4 wat by δ_C 25.69 resoneer met protone H4a en H4b by δ_H 1.46 en 1.33.

Gevolglik kan al die koolstofatome (in die piraanring en newestaande tot die piraanring) waaraan daar tentatief simbole toegeken is, volledig toegeken word. Die finale toekennings van protone en koolstofatome is vervat in Tabel 2.13. Korrelasie tussen protone H-11a, H-11b, H-12a en H-12b is bevestig in COSY en TOCSY analyses en die afleidings was dus korrek.

Tabel 2.13: Volledige toekenning van koolstofatome wat tentatief toegeken was. Die ^{13}C - en ^1H -chemiese verskuiwings (d.p.m.) word ook hierop aangedui.

Tentatiewe toekenning	Koolstof	δ_{C}	δ_{H}	Protone
J	4	25.69	1.46, 1.33	4
G	5	33.35	1.37	5
B	6	74.24	3.38	6
A	7	82.01	3.78	7
C	8	28.47	1.96, 1.60	8a, 8b
D	9	32.45	2.02, 1.51	9a, 9b
E	10	78.92	3.91	10
F	11	35.11	1.60, 1.46	11a, 11b

Tabel 2.14: ^{13}C -chemiese verskuiwings (d.p.m.), multiplisiteite^a, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ -korrelasies^b, $^2,^3\text{J}_{\text{CH}}$ -korrelasies^c, ^1H -integrale, multiplisiteite en J_{HH} -waardes (Hz).

Koolstof ^d	δ_{C}	δ_{H}	
		$^1\text{J}_{\text{CH}}$ -korrelasies ^b	$^2\text{J}_{\text{CH}}$ - en $^3\text{J}_{\text{CH}}$ -korrelasies ^c
1	177.6	-	-
7	82.01, d ^e	3.78, 1H, k ^f , J 7.2	(3.38) ^g , 2.02, 1.60, 1.37
10	78.92, d	3.91, 1H, tt, J 7.5; 5.3	3.78, 1.96, 1.60, 1.51, 1.46
6	74.24, d	3.38, 1H, k, J 6.1	(3.78), 1.96, 1.60, 1.37
11	35.11, t ^h	1.60, 1H, ddt, J 12.2; 10.0; 7.8 1.46, 1H, m ⁱ	2.02, 1.51
2	34.00, t	2.35, 2H, bt ^j , J 6.7	-
5	33.35, t	1.37, 2H, m	3.78, 3.38
9	32.45, t	2.02, 1H, dddd, J 11.7; 8.1; 5.3; 2.4 1.51, 1H, ddd, J 11.6, 9.9, 8.3	(3.78), 1.96, 1.60, 0.88 ^k
14	31.83, t	1.28, 2H, m	-
13	29.42, t	1.28, 2H, m	-
8	28.47, t	1.96, 1H, dddd, J 12.1; 7.9; 6.7; 2.6 1.60, 1H, ddd, J 15.5; 9.9; 7.8	(3.38), 2.03, 1.51
4	25.69, t	1.46, 1H, m 1.33, 1H, m	3.38, (1.59), 1.48, 1.45, 1.38, 1.28
12	25.59, t	1.51, 1H, m 1.37, 1H, m	-
3	24.79, t	1.66, 2H, k _n ^l , J 7.3	-
15	22.64, t	1.29, 2H, m	(1.28) x 2, 0.88
16	14.10, k	0.88, 3H, t, J 6.5	1.29

a. DEPT b. HSQC c. HMBC d. Koolstoftoekennings is gemaak op grond van struktuur L8. Nadat hierdie struktuur as korrek vir komponent 5642 aanvaar is.
e. Doeplet. f. Kwartet. g. Korrelasies in hakies dui op swak korrelasies. h. Triplet. i. Multiplet. j. Breë triplet. k. Aktivering van naby geleë sein (δ_{C} 31.83) lei tot hierdie korrelasie. l. Kwintet.

Tabel 2.15: ^1H -chemiese verskuiwings (d.p.m.), multiplisiteit en korrelasies tussen protone soos verkry uit die COSY en 1D TOCSY analises.

Protone	δ_{H}	Multiplisiteit	Kortafstand korrelasie ($^3J_{\text{HH}}$)	$^4J_{\text{HH}}$, $^5J_{\text{HH}}$	1D TOCSY-korrelasies
2	2.35	t, 2H	1.66	-	((3.91)) ^a , 1.66, (1.60) ^b , 1.46, 1.38, (0.88)
3	1.66	k _n , 2H	2.35, 1.46	-	((3.91)), ((3.78)), ((3.38)), 2.35, (2.02), (1.96), 1.60, ((1.51)), 1.46, 1.37
4a, 11b	1.46	m, 2H	3.91, 1.66, 1.37	-	2.35, 1.66, 1.51
4b	1.33	m, 1H	# ^c	-	# ^d
5, 12b	1.37	m, 3H	2.02, 1.60, # ^c	-	(3.91), 3.78, 3.38, ((2.02)), ((1.96)), 1.66, 1.60, 1.51, 1.46, 1.28, 0.88
6	3.38	k, 1H	3.78, 1.37	-	((3.91)), 3.78, (2.02), 1.96, 1.60, 1.51, 1.37, 1.33, 1.28
7	3.78	k, 1H	3.38, 1.96, 1.60	2.02	(3.91), 3.38, ((2.35)), 2.02, 1.96, ((1.66)), 1.60, 1.51, ((1.28))
8a	1.96	m, 1H	3.78, 2.02, 1.60, 1.51	-	3.91, 3.78, 3.38, 2.02, 1.60, 1.51, (1.37)
8b, 11a	1.60	m, 2H	3.91, 3.79, 2.04, 1.96, 1.46, 1.51, 1.37	-	3.91, 3.78, 3.38, (2.35), 2.02, 1.96, (1.66), 1.51, 1.46, (1.37)
9a	2.02	m, 1H	3.91, 1.96, 1.60, 1.51	3.79	3.91, 3.78, 3.38, 1.96, 1.60, 1.51, (1.46), ((1.37))
9b, 12a	1.51	m, 2H	3.91, 2.02, 1.96, 1.37	1.60	3.91, 3.78, 3.38, ((2.35)), 2.02, 1.96, ((1.66)), 1.60, 1.37, 1.28, 0.88
10	3.91	k _n , 1H	2.02, 1.60, 1.51, 1.46	-	3.78, 3.38, (2.35), 2.02, 1.96, 1.60, 1.51, 1.46, 1.37, (1.28)
13, 14	1.28	m, 4H	# ^c	-	# ^d
15	1.29	m, 2H	# ^c	-	# ^d
16	0.88	m, 3H	# ^c	-	1.28, 1.37, 1.51

a. Baie swak korrelasie.

b. Swak korrelasie.

c. COSY te kompleks in hierdie area om definitiewe korrelasies te identifiseer.

d. Geen TOCSY1D-inligting beskikbaar by hierdie chemiese verskuiwing nie.

Ter bevestiging van toekennings, is ^{13}C - en ^1H -simulasies vir struktuur L8 uitgevoer met behulp van ACD/I-Lab Web⁵¹. Die gesimuleerde ^{13}C - en ^1H -chemiese verskuiwings word in Tabel 2.16 gegee.

Tabel 2.16: Gesimuleerde ^{13}C - en ^1H -chemiese verskuiwings vir die voorgestelde struktuur van komponent 5642 hierbo.

Koolstof	δ_{C}	δ_{H}	Standaard Afwyking in δ_{C} ^a (d.p.m.)
1	174.49		1.23
2	34.11	2.47, 2.23	0.902
3	24.18	1.82	0.167
4	24.48	1.90, 1.65	1.848
5	28.72	2.05	1.206
6	75.89	3.78	4.715
7	75.0	4.92	4.735
8	27.99	2.18, 1.46	0.38
9	26.6	1.88, 1.53	1.843
10	78.77	3.35	3.975
11	35.16	1.50, 1.45	1.427
12	26.03	1.16	0.388
13	30.14	1.34	0.262
14	31.71	1.33	0.374
15	22.55	1.33	0.041
16	14.05	0.88	3.86

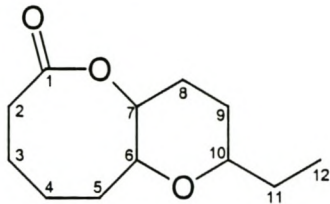
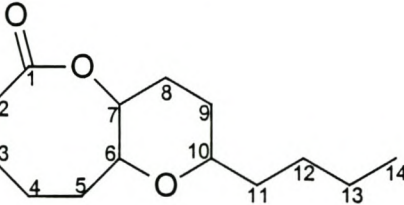
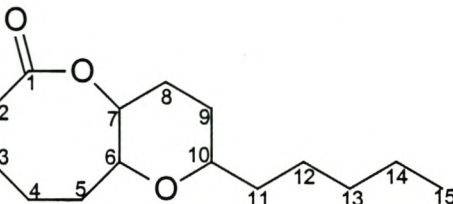
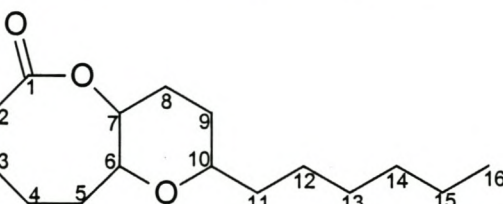
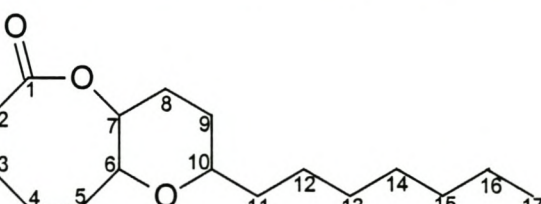
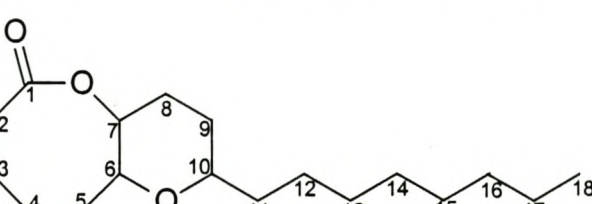
a. Hierdie afwyking hang af van die aantal verbindings met die betrokke tipe chemiese omgewing wat in die databasis beskikbaar is. 'n Klein fout kan dus ook beteken dat daar 'n beperkte getal verbindings van die betrokke verbindingstipe in die databasis opgeneem is.

Op grond van die voorafgaande redenasie is die struktuur L8 aan komponent 5642 toegeken. Die enigste oorblywende probleem is dat daar in die IR spektra van hierdie komponent 'n absorpsieband 3577 cm^{-1} voorkom wat aan die OH-groep van 'n karboksielsuur toegeskryf kan word. Omdat hierdie spektrum in 'n ander laboratorium opgeneem en die data daar verwerk is, kan nou nie meer vasgestel word of hierdie absorpsieband aan 'n onsuiverheid of die toestand van die sisteem toegeskryf kan word nie. Van vorige data en bespreking is dit bekend dat komponente 4378, 5009, 5263, 5642, 5857, 6129 en 6181 (moontlik vertak) homoloë is. Van vorige redenasies is die molekulêre massa (M_r) van komponent 5009 bekend (240 Da), asook die molekulêre formule. Komponent 5009 bevat dus twee koolstofatome minder as

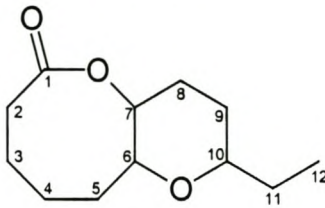
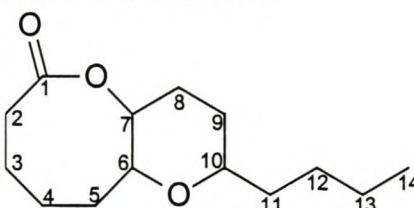
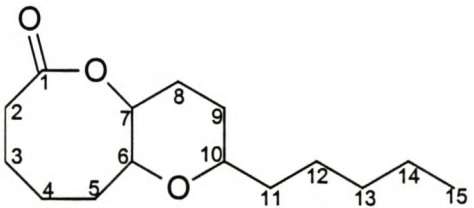
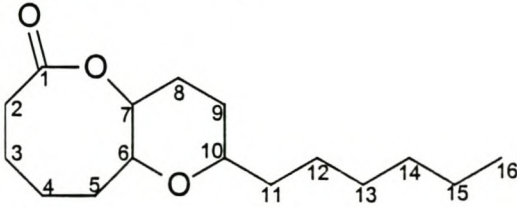
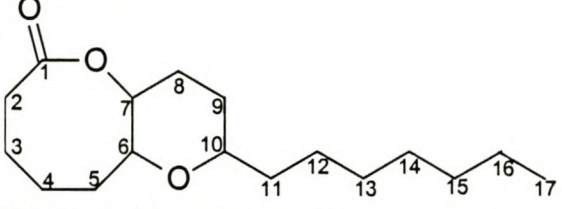
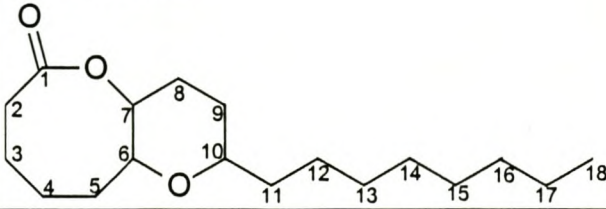
komponent 5642 en daar kan aanvaar word dat komponent 5009 se basiese struktuur dieselfde sal wees as dié van komponent 5642, met twee CH₂-groepe minder in die alifatiese sykettinggedeelte. In die massaspektra van al hierdie komponente, behalwe dié van komponent 4378, kan 'n swak molekulêre ioon waargeneem word. Op grond van hierdie data en deur vergelyking van die retensietye van komponente 4378, 5263, 5857 en 6129 met dié van komponente 5009 en 5642 is hierdie komponente tentatief geïdentifiseer soos in Tabel 2.17 aangedui word.

Al die verbindings wat in die preorbitale afskeiding van die suni-ooi geïdentifiseer is, word gegee in Tabel 2.18.

Tabel 2.17: Identifikasie van komponente 5009 en 5642 en tentatiewe identifikasie van komponente 4378, 5263, 5857 en 6129.

Komponent No.	Molekulêre massa	Verbinding
4378	-	
5009	240	
5263	254	
5642	268	
5857	282	
6129	296	

Tabel 2.18: Die komponente wat in die preorbitale afskeiding van die suni-ooi geïdentifiseer is.

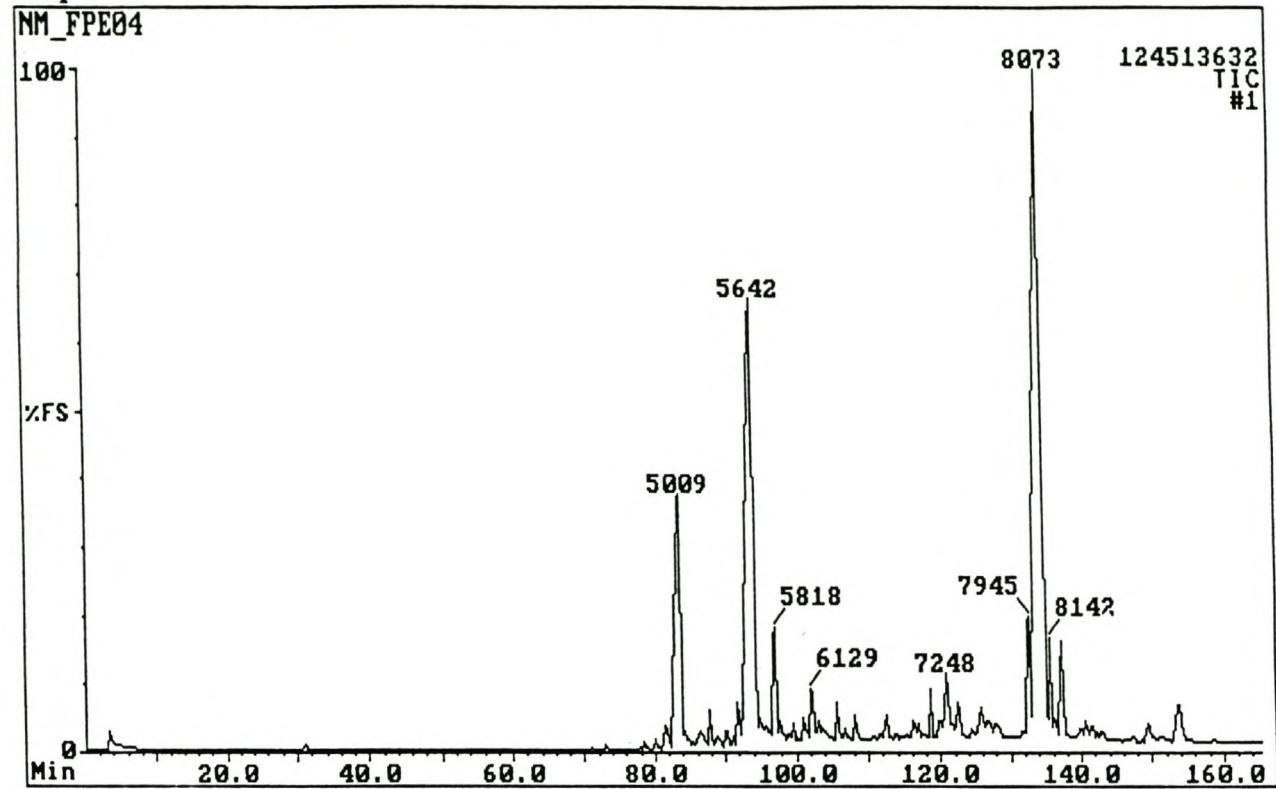
Komponent no.	Verbinding	Analitiese metode
1863	Bensoësuur	a,b
4137	Tetradekanoësuur	a,b
4378		a, i
4797	Heksadekanoësuur	a,b
5009		a,c,d,e,f,g
5114	Heptadekanoësuur	a,b
5263		a
5311	(9Z, 12Z)-Oktadekadiënoësuur	a,b
5327	Z-9-Oktadekenoësuur	a,b
5404	Oktadekanoësuur	a,b
5642		a,c,d,e,f,h
5857		a
5876	18-Metielnonadekanoësuur	a,i
5971	Ikosanoësuur	a,b
6129		a

Tabel 2.18: Vervolg.

Komponent no.	Verbinding	
6163	19-Metielikosanoësuur	a,i
6235	Henikosanoësuur	a,b
6398	20-Metielhenikosanoësuur	a,i
6490	Dokosanoësuur	a,b
6688	1-Hidroksiikos-2-ielbutanoaat	a,i
6733	Trikosanoësuur	a,i
6744	2-Hidroksiikos-1-ielbutanoaat	a,i
6825	Onversadigde hidroksibutanoaat	a
6888	22-Metieltrikosanoësuur	a,i
6907	1-Hidroksiikos-2-ielpentanoaat	a,i
6952	1-Hidroksihenikos-2-ielbutanoaat	a,i
6966	2-Hidroksiikos-1-ielpentanoaat	a,i
6984	Tetrakosanoësuur	a,b
7009	2-Hidroksihenikos-1-ielbutanoaat	a,i
7052	Onversadigde hidroksipentanoaat	a
7107	Skwaleen	a,b
7184	1-Hidroksidokos-2-ielbutanoaat	a,i
7248	2-Hidroksidokos-1-ielbutanoaat	a,i
7281	Onversadigde hidroksibutanoaat	a
7348	Onversadigde hidroksibutanoaat	a
7456	1-Hidroksidokos-2-ielpentanoaat	a,i
7537	2-Hidroksidokos-1-ielpentanoaat	a,i
7599	1-Hidroksitrikos-2-ielbutanoaat	a,i
7667	Onversadigde hidroksipentanoaat	a
7902	2-Hidroksitrikos-1-ielpentanoaat	a,i
8074	Cholesterol	a,b
8142	α -Tokoferol/Vitamien E	a,b
8170	Desmosterol	a,b
8234	Ongeïdentifiseerde steroïed	a
8391	2-Hidroksitetrakos-1-ielpentanoaat	a,i

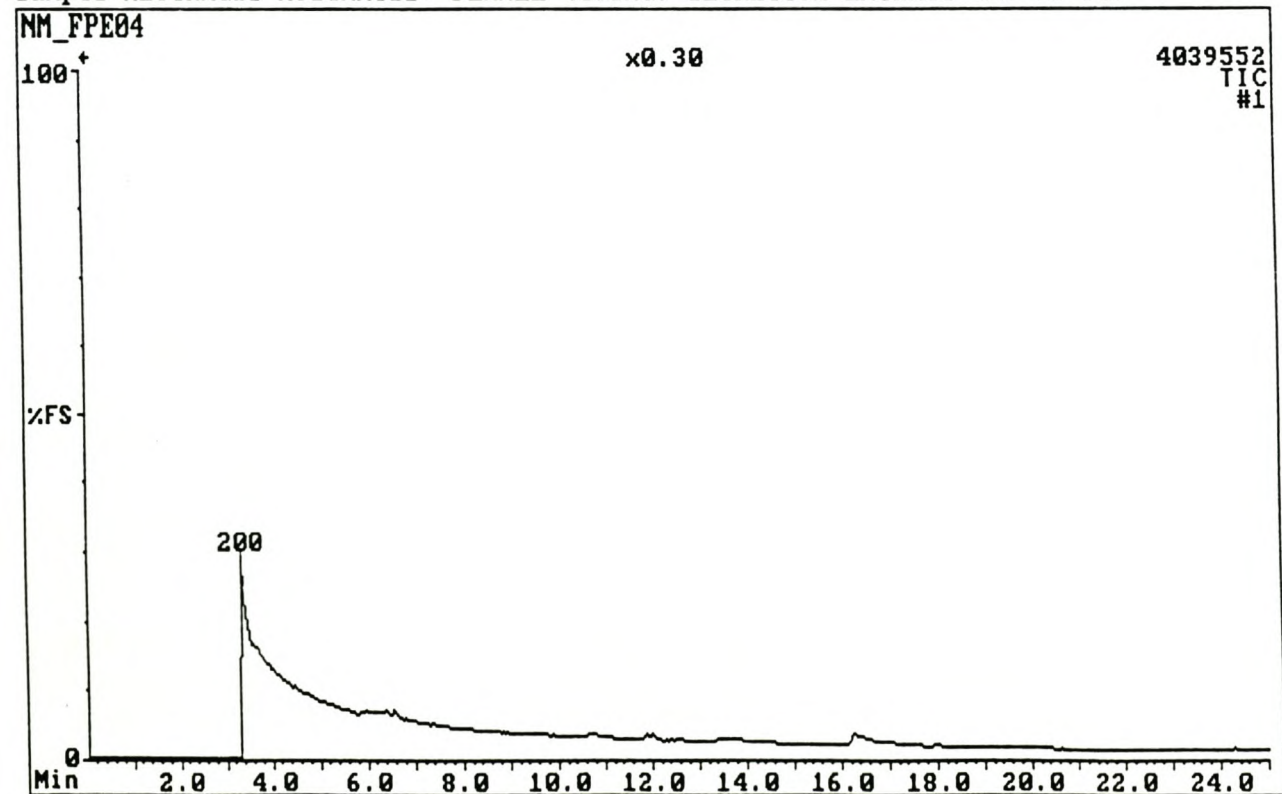
- Lae resolusie GC-EI-MS.
- Retensietydvergelyking met kommersieel beskikbare/sintetiese verbinding.
- Lae resolusie GC-CI-MS
- GC-FTIR
- KMR (^1H , ^{13}C , APT).
- HPLC
- HRMS
- KMR (DEPT, 2D COSY, 2D HSQC, 2D HMBC, 1D TOCSY).
- Volgens retensietyd inkrement.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



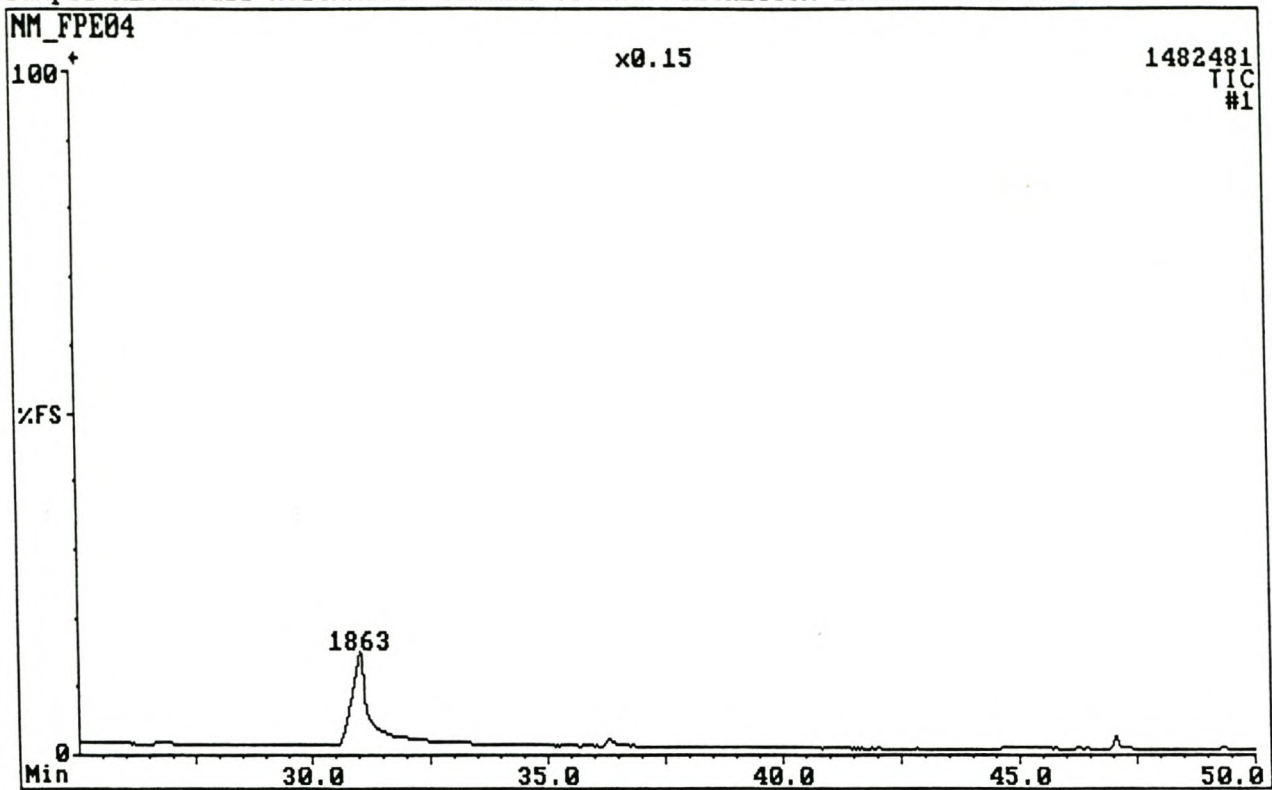
Figuur 2.4: Die totale ionstroomchromatogram (TIC) van die preorbitale afskeiding van die suni-ooi (PS-089-kolom).

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



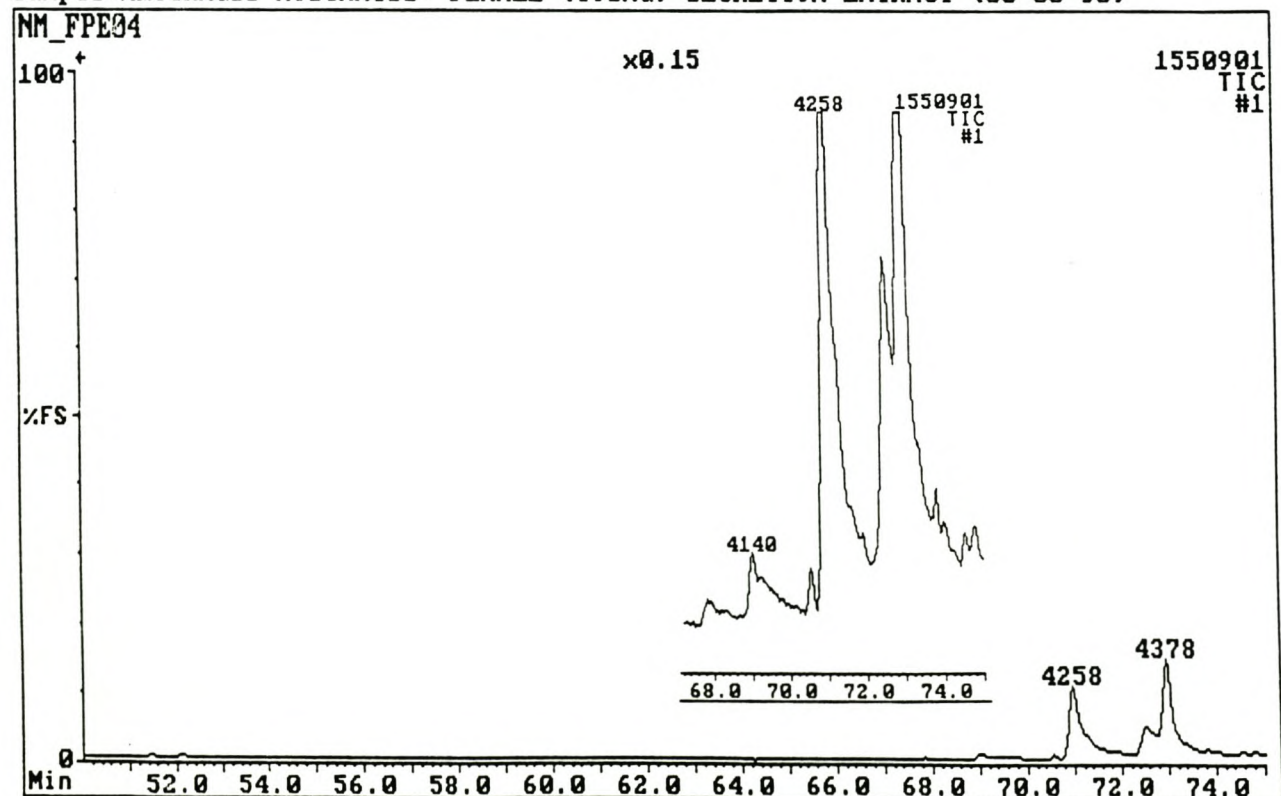
Figuur 2.5a: Die TIC van die preorbitale afskeiding van die suni-ooi.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



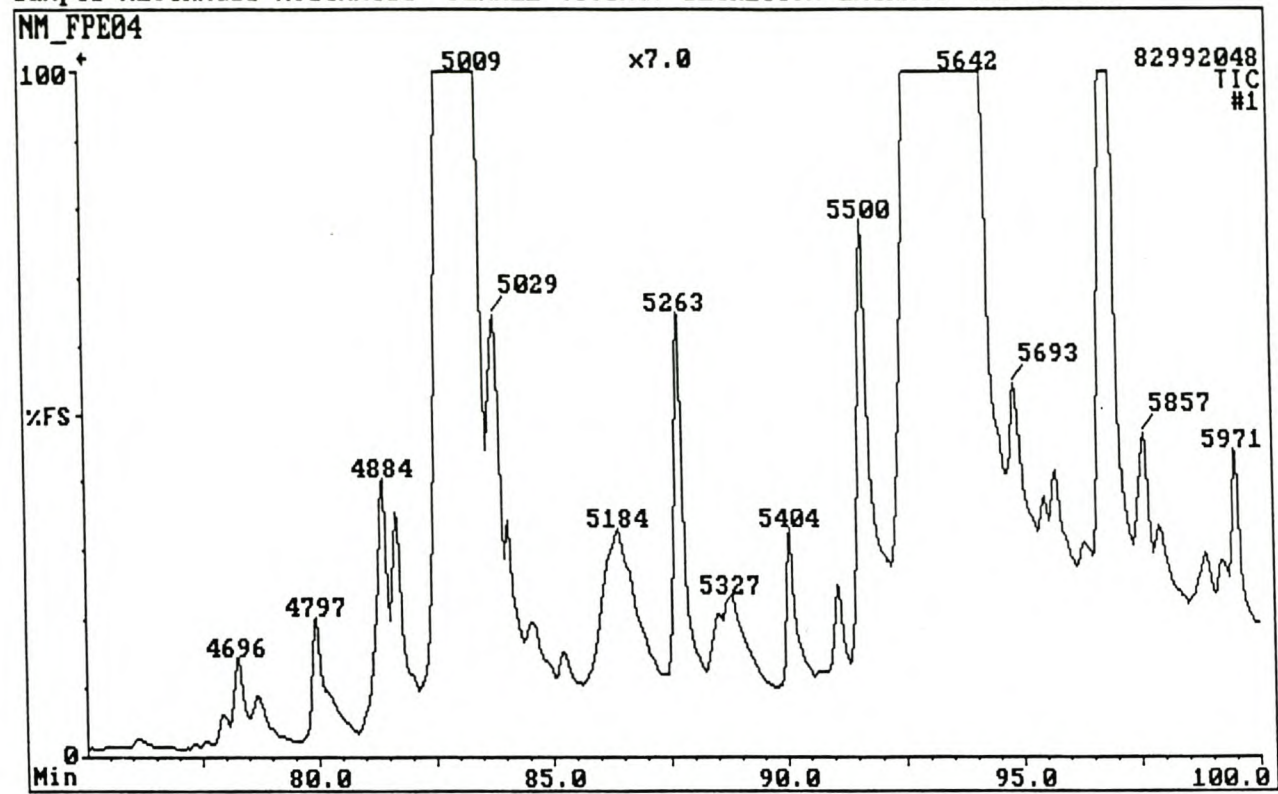
Figuur 2.5b: Die TIC van die preorbitale afskeiding van die suni-ooi (vervolg).

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



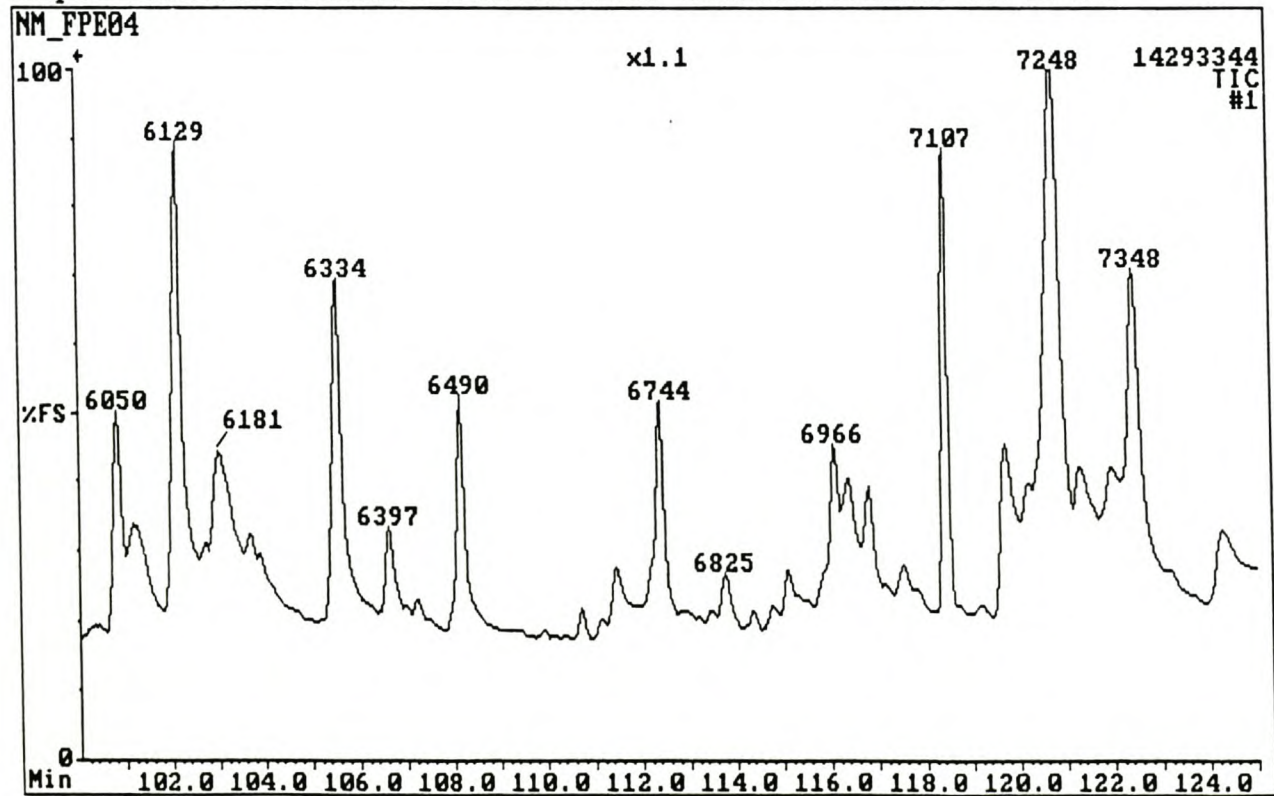
Figuur 2.5c: Die TIC van die preorbitale afskeiding van die suni-ooi (vervolg).

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



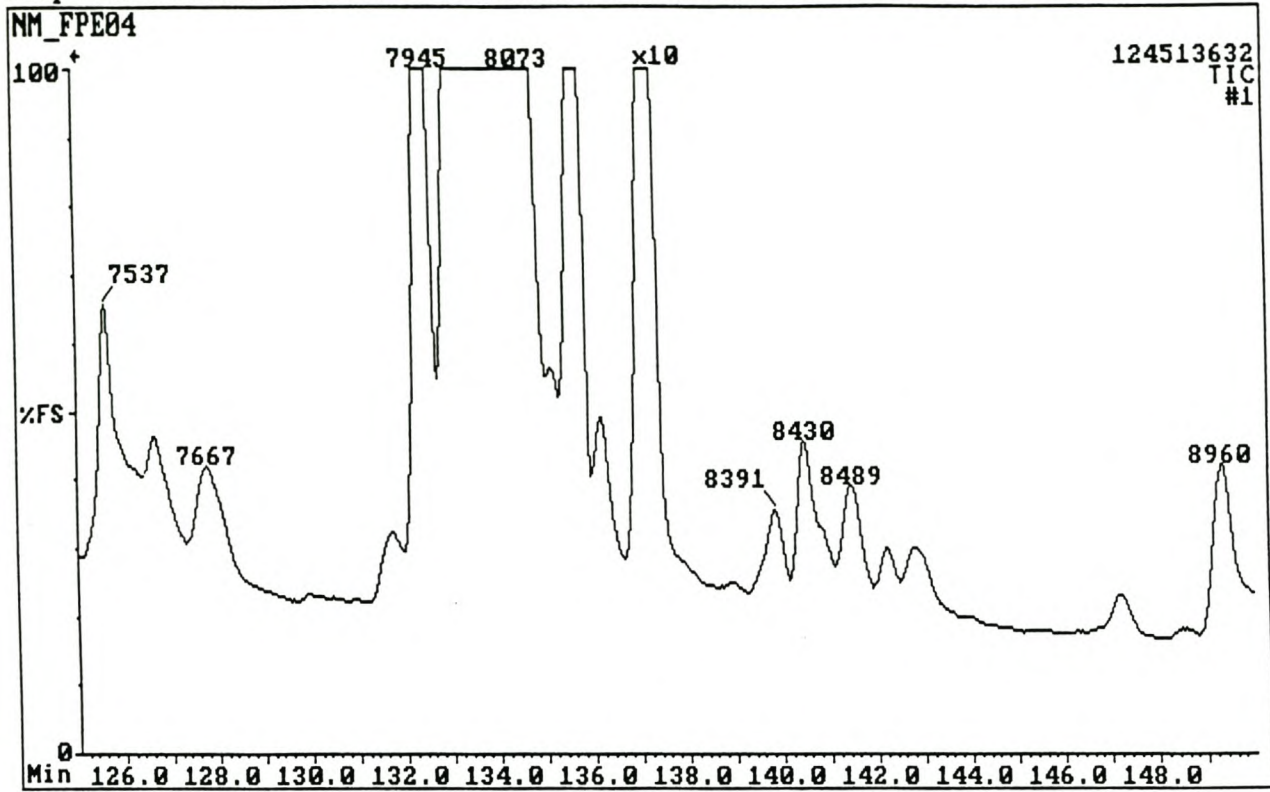
Figuur 2.5d: Die TIC van die preorbitale afskeiding van die suni-ooi (vervolg).

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



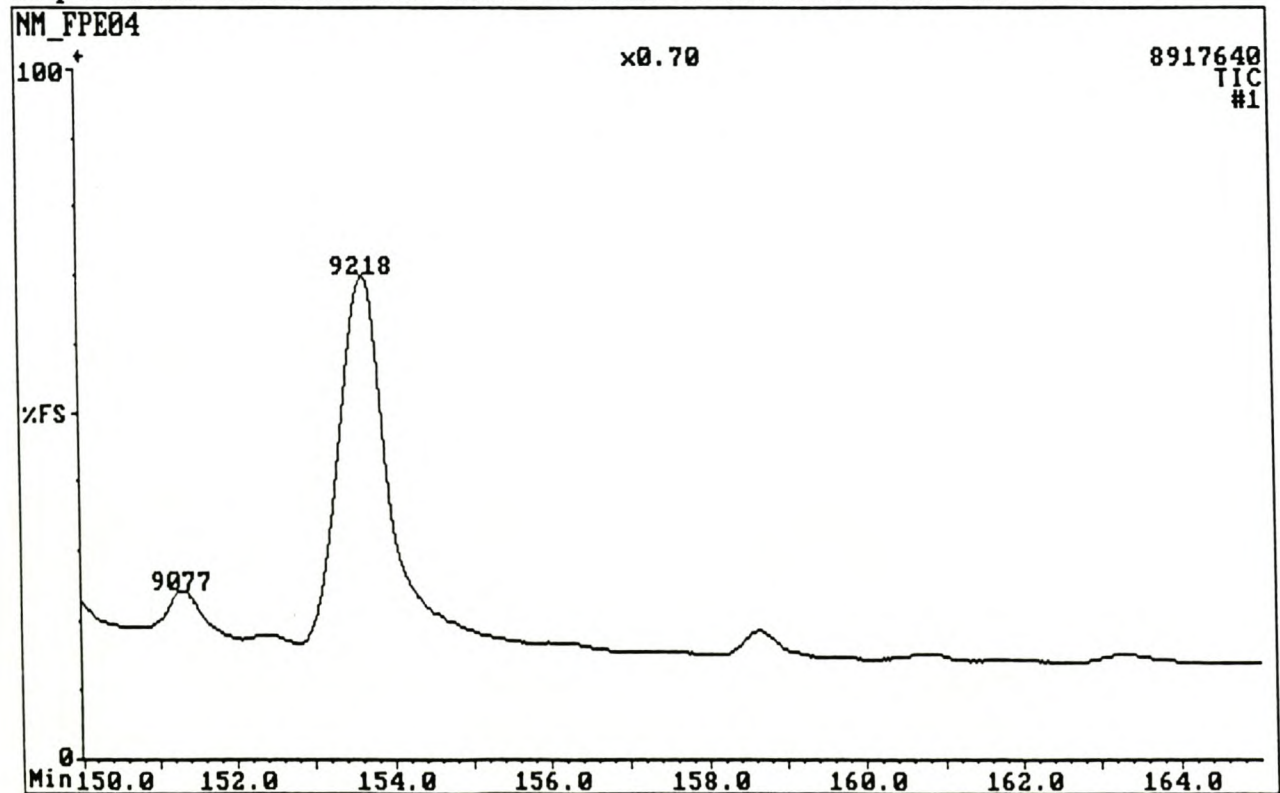
Figuur 2.5e: Die TIC van die preorbitale afskeiding van die suni-ooi (vervolg).

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



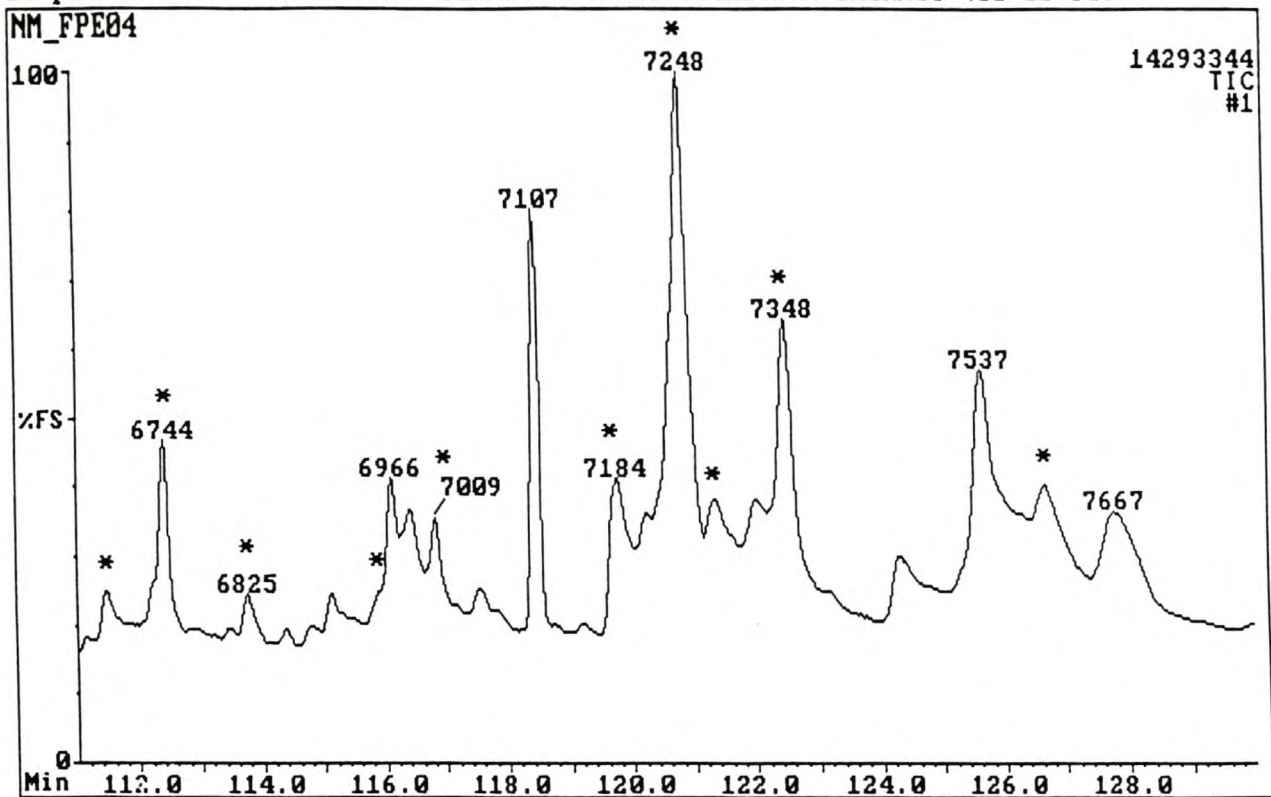
Figuur 2.5f: Die TIC van die preorbitale afskeiding van die suni-ooi (vervolg).

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



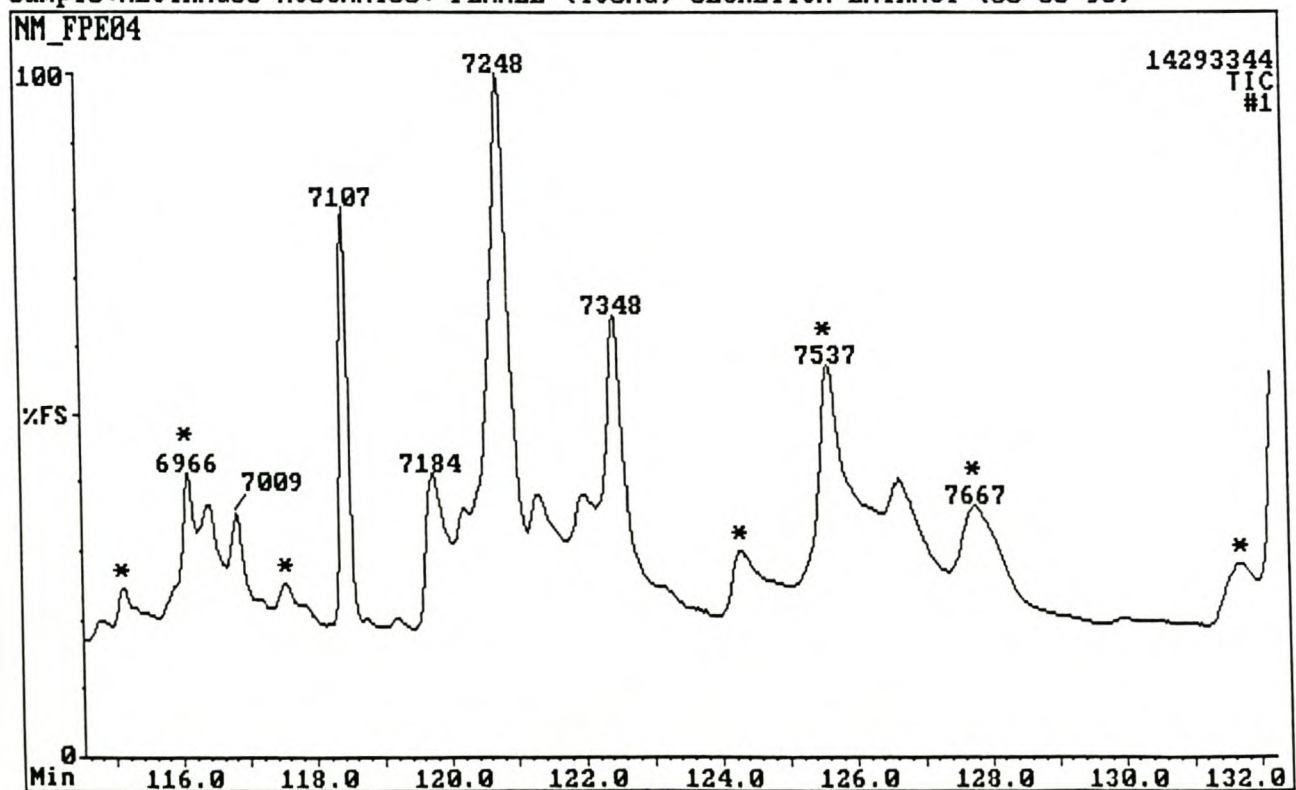
Figuur 2.5g: Die TIC van die preorbitale afskeiding van die suni-ooi (vervolg).

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



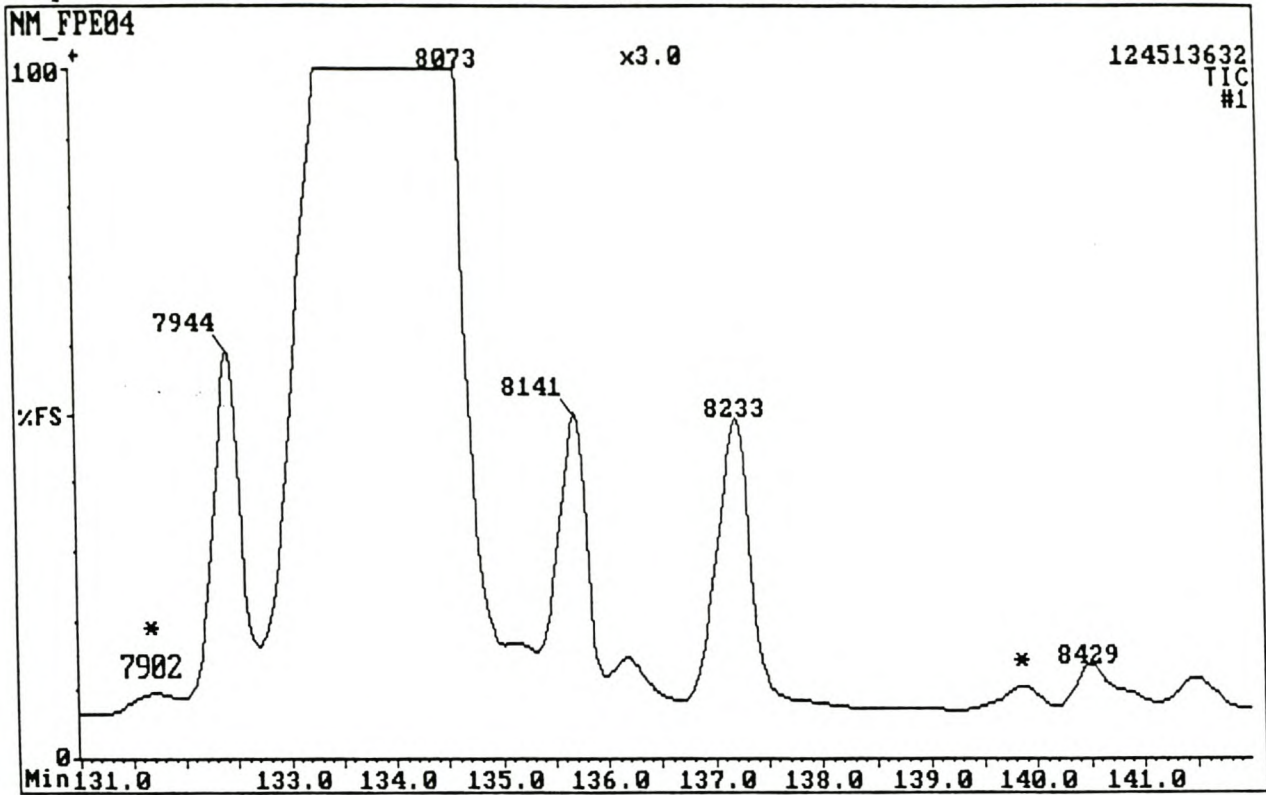
Figuur 2.6: TIC van die preorbitale afskeiding van die suni-ooi. Die hidroksi-esters is met * aangedui.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



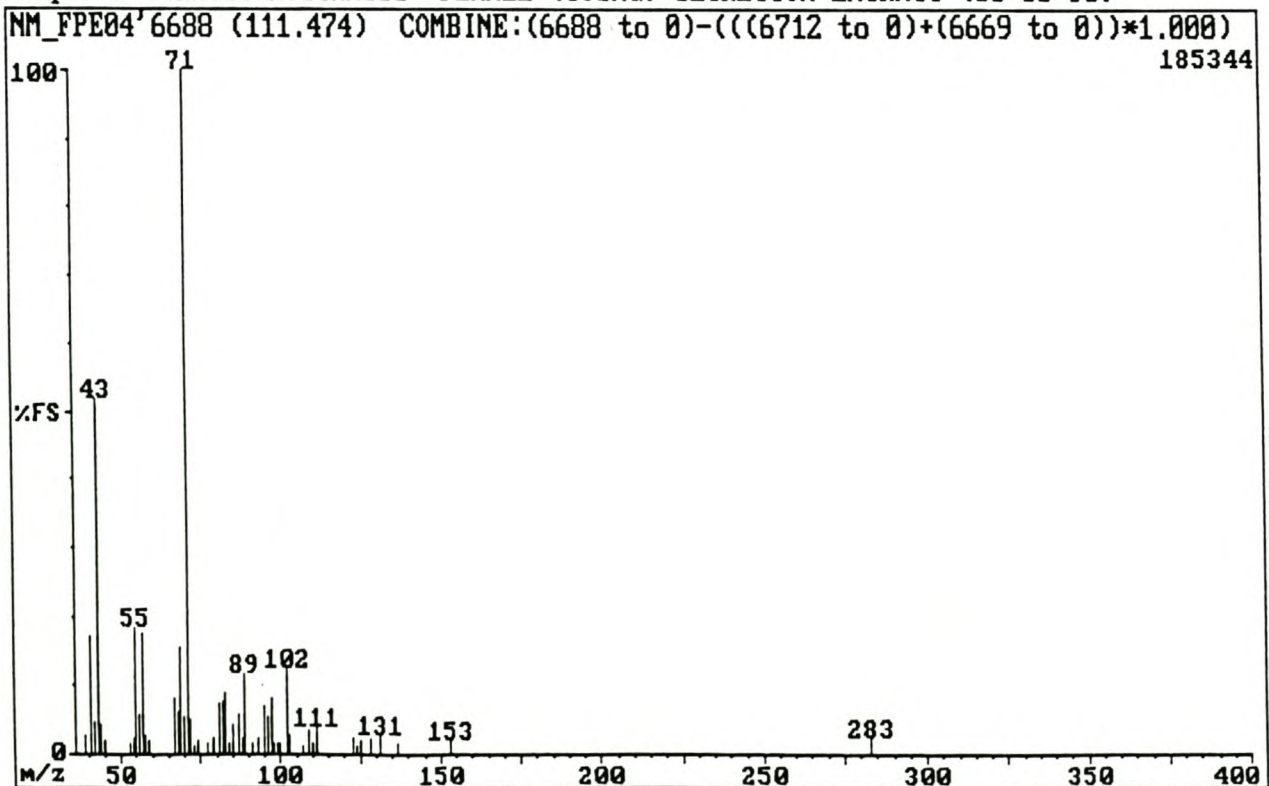
Figuur 2.7a: TIC van die preorbitale afskeiding van die suni-ooi. Die hidroksiësters is met * aangedui.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



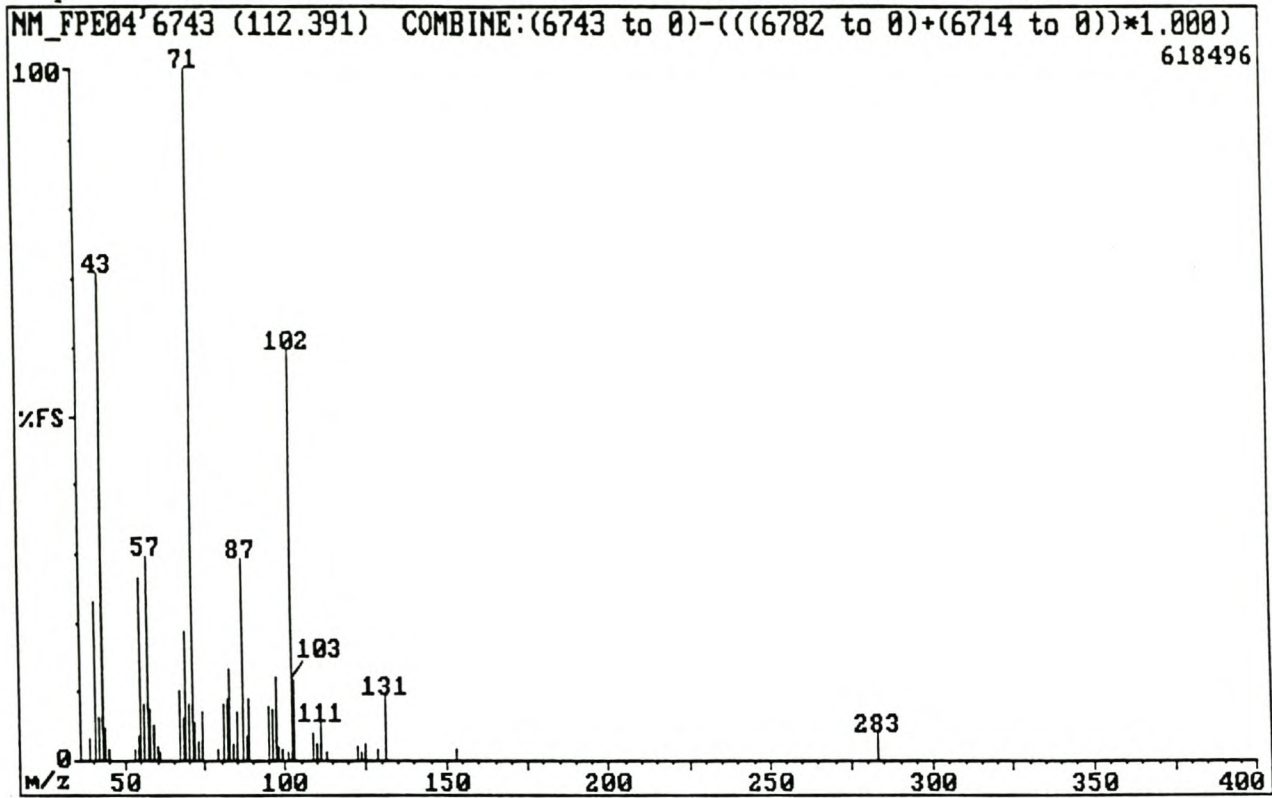
Figuur 2.7b: TIC van die preorbitale afskeiding van die suni-ooi. Die hidroksiësters is met * aangedui.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



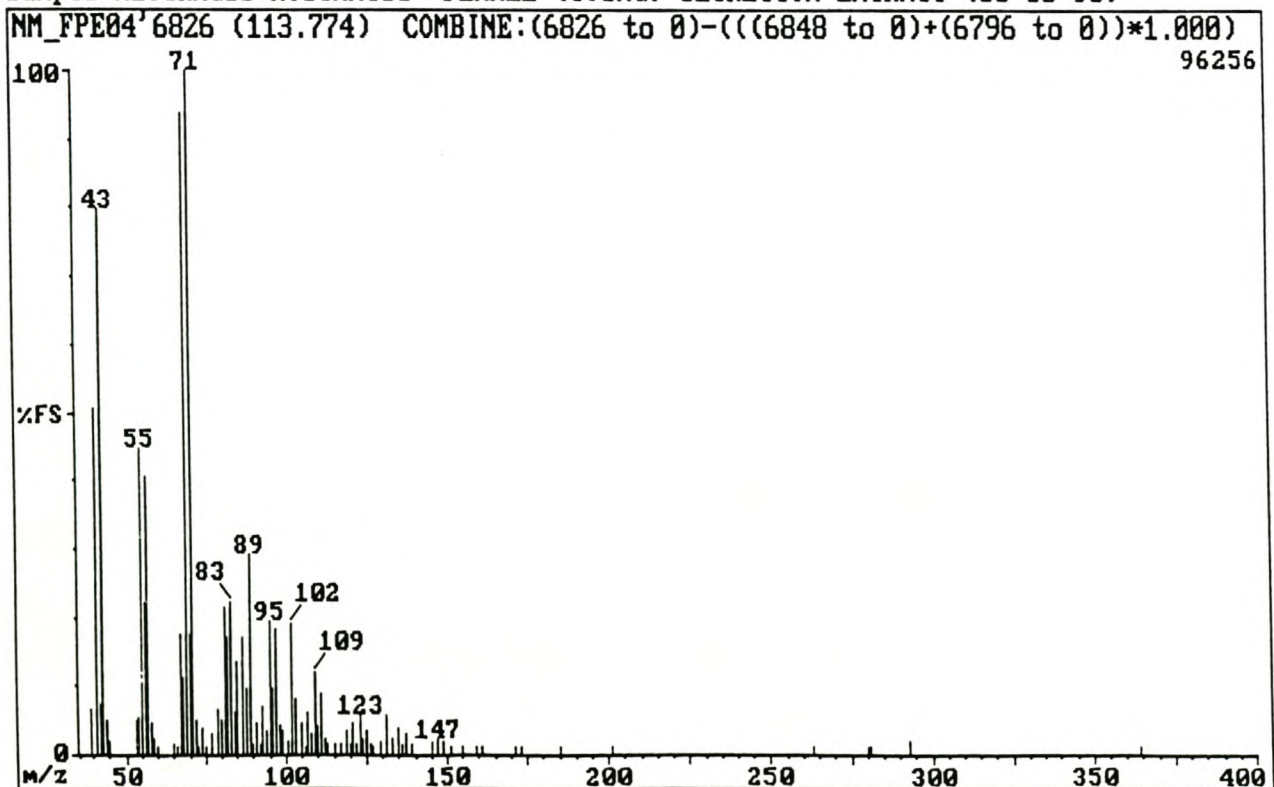
Figuur 2.8: EI-massaspektrum van komponent 6688 [1-Hidroksiïkos-2-ielbutanoaat].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



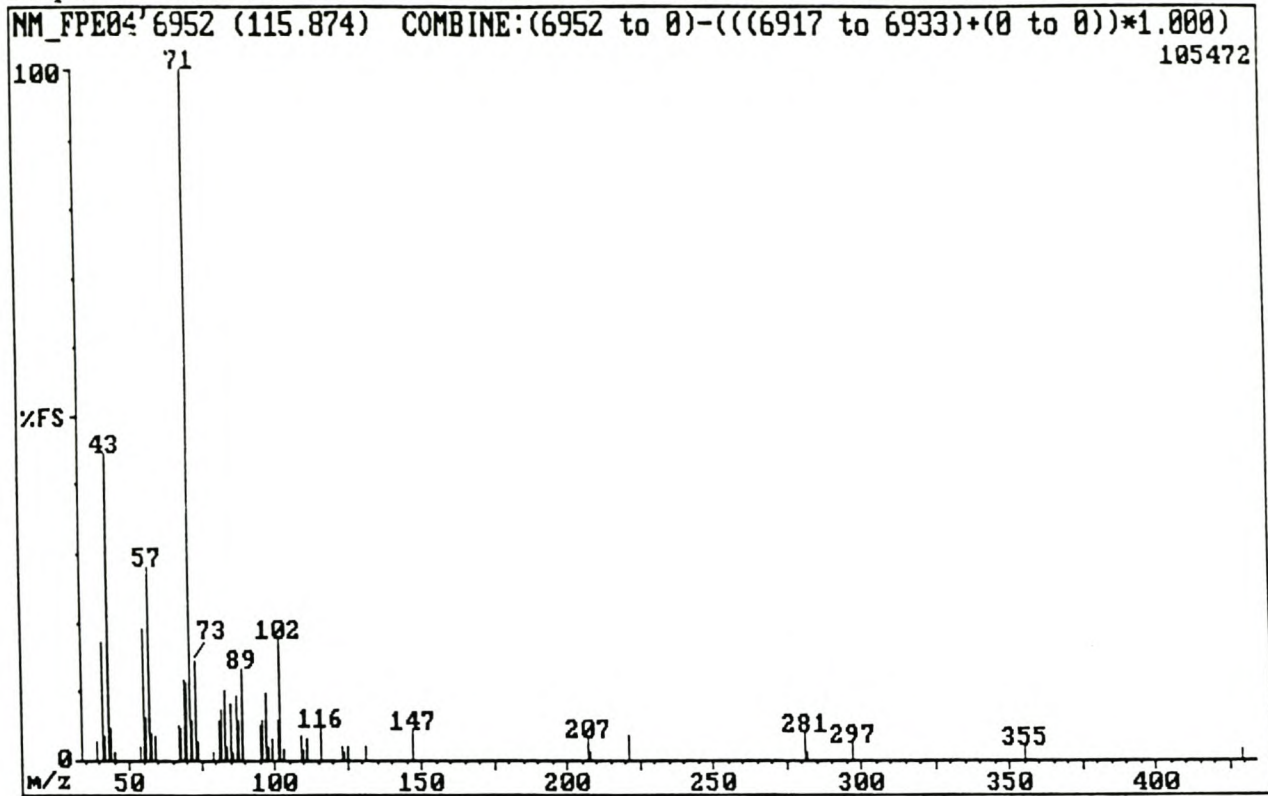
Figuur 2.9: El-massaspektrum van komponent 6744 [2-Hidroksiïkos-1-ielbutanoaat].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



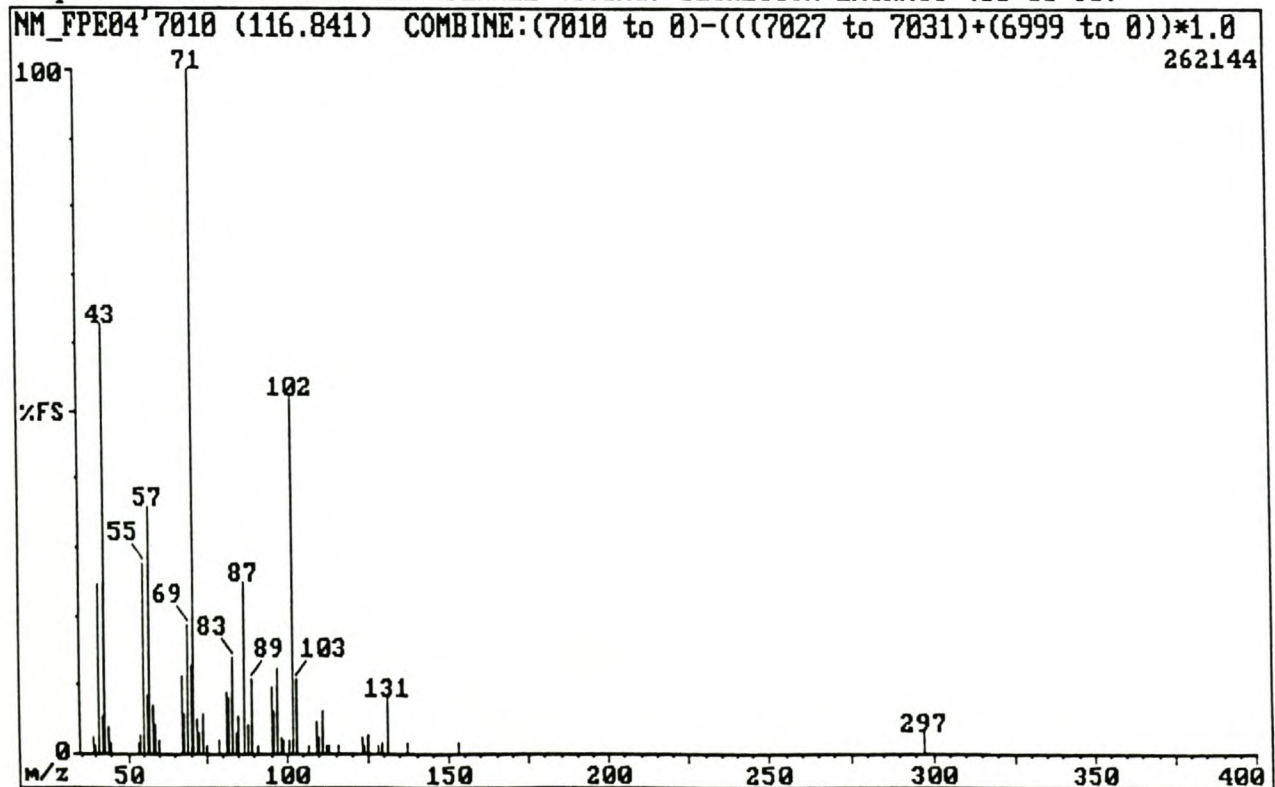
Figuur 2.10: El-massaspektrum van komponent 6825 [Onversadigde hidroksibutanoaat].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



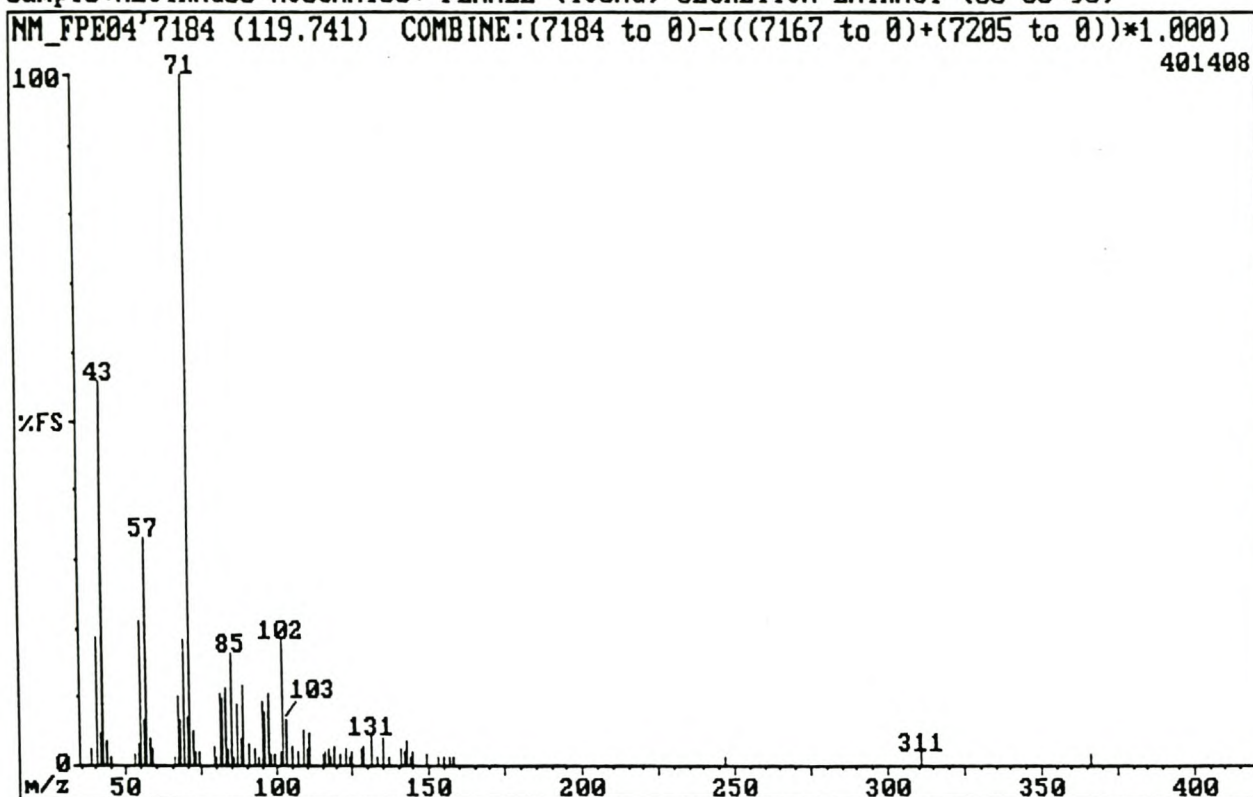
Figuur 2.11: EI-massaspektrum van komponent 6952 [1-Hidroksihenikos-2-ielbutanoaat].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



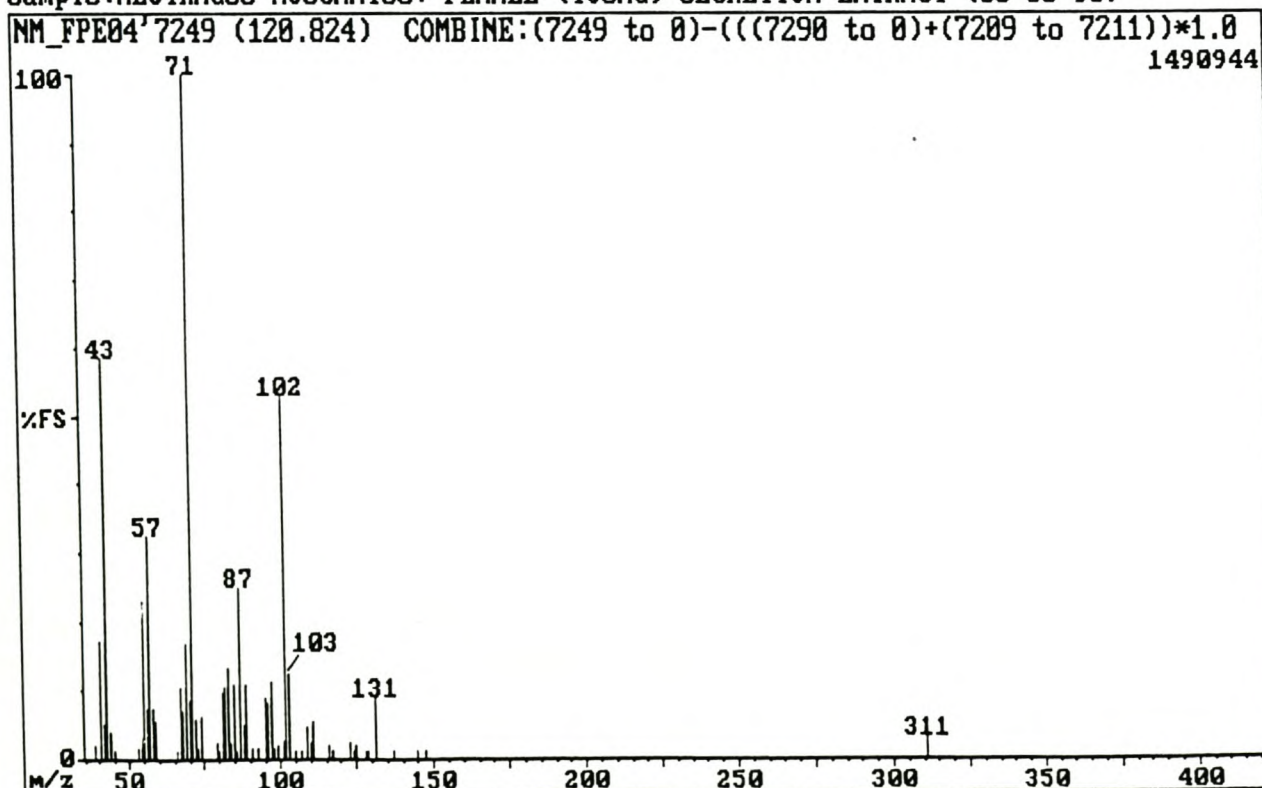
Figuur 2.12: EI-massaspektrum van komponent 7009 [2-Hidroksihenikos-1-ielbutanoaat].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



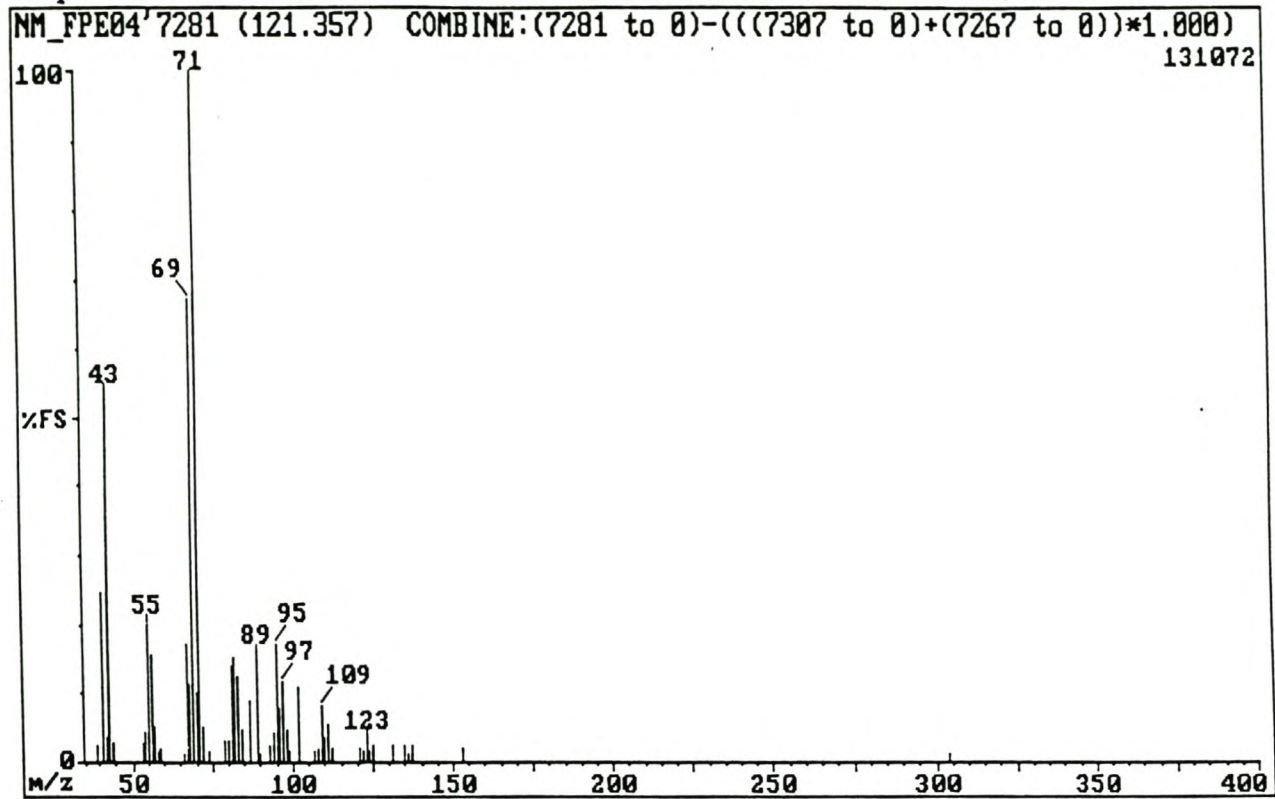
Figuur 2.13: EI-massaspektrum van komponent 7184 [1-Hidroksidokos-2-ielbutanoaat].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



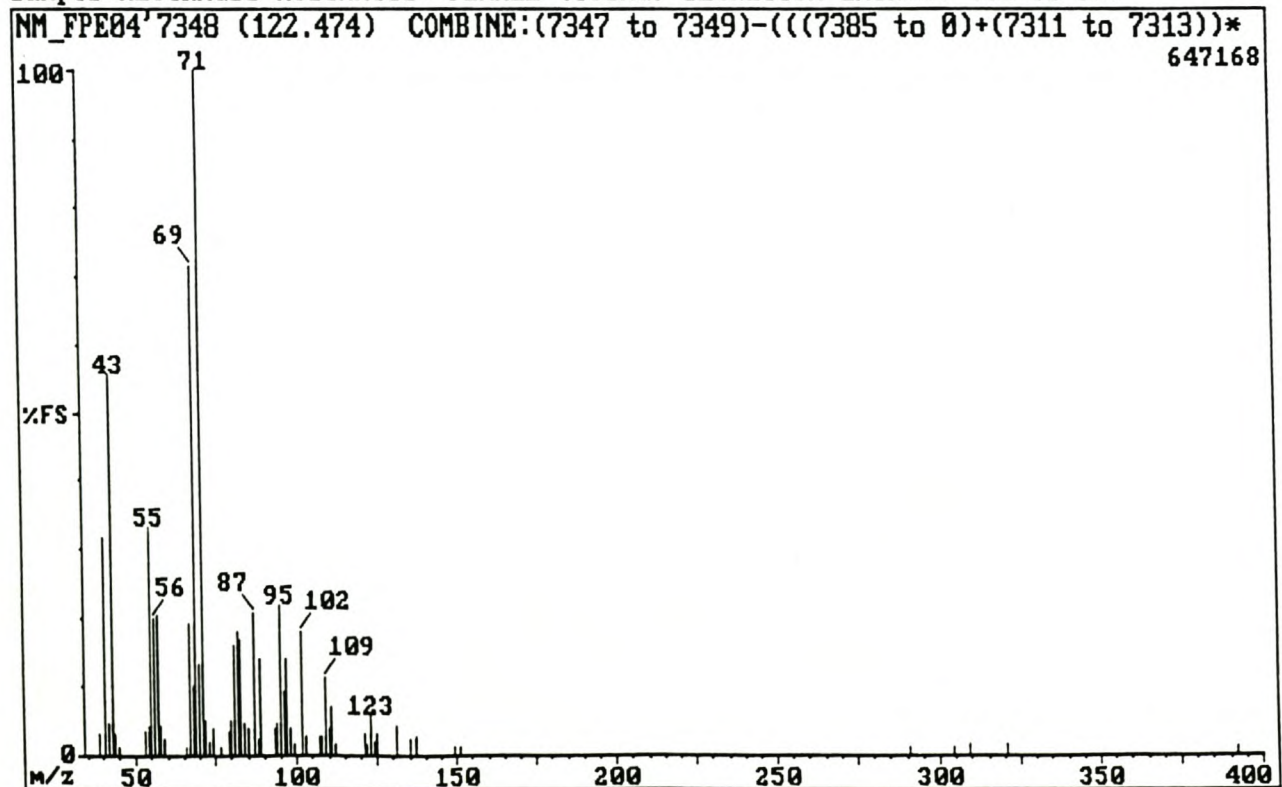
Figuur 2.14: EI-massaspektrum van komponent 7248 [2-Hidroksidokos-1-ielbutanoaat].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



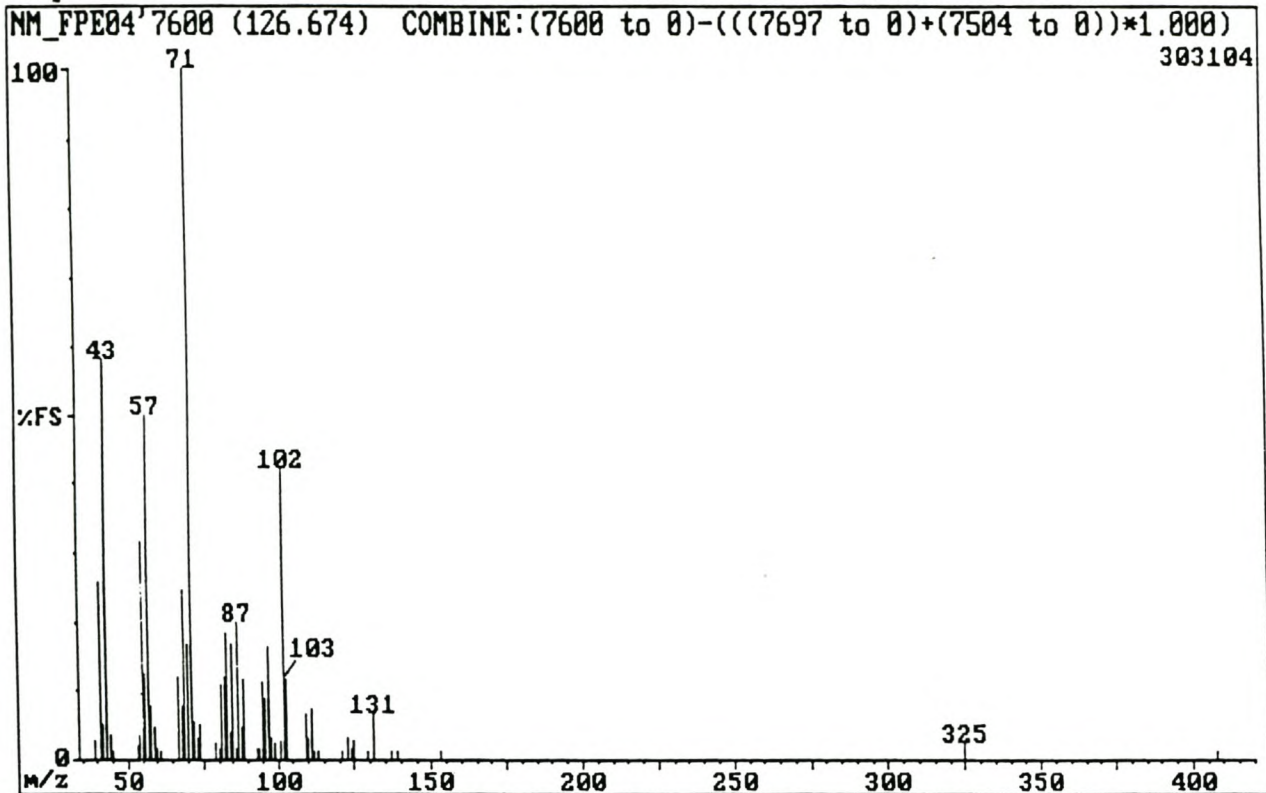
Figuur 2.15: EI-massaspektrum van komponent 7281 [Onvesadigde hidroksibutanoaat].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



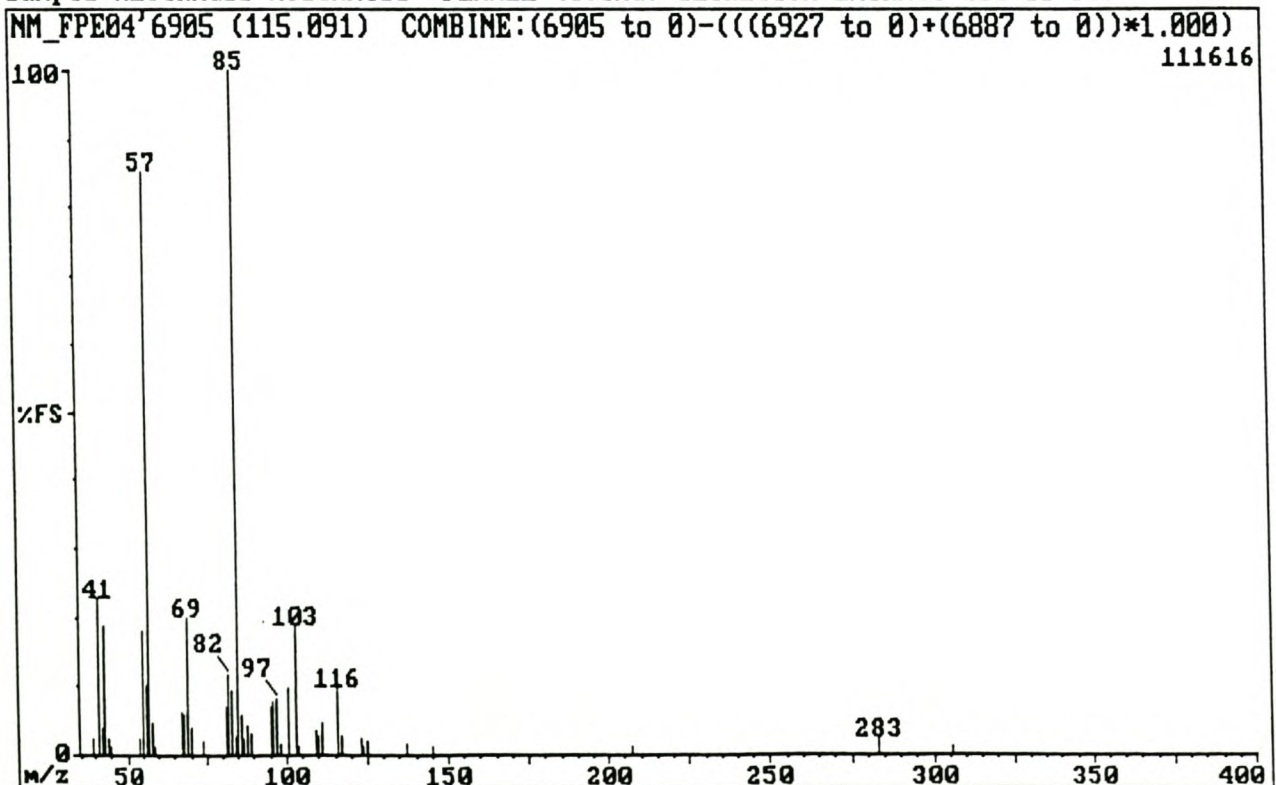
Figuur 2.16: EI-massaspektrum van komponent 7348 [Onversadigde hidroksibutanoaat].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



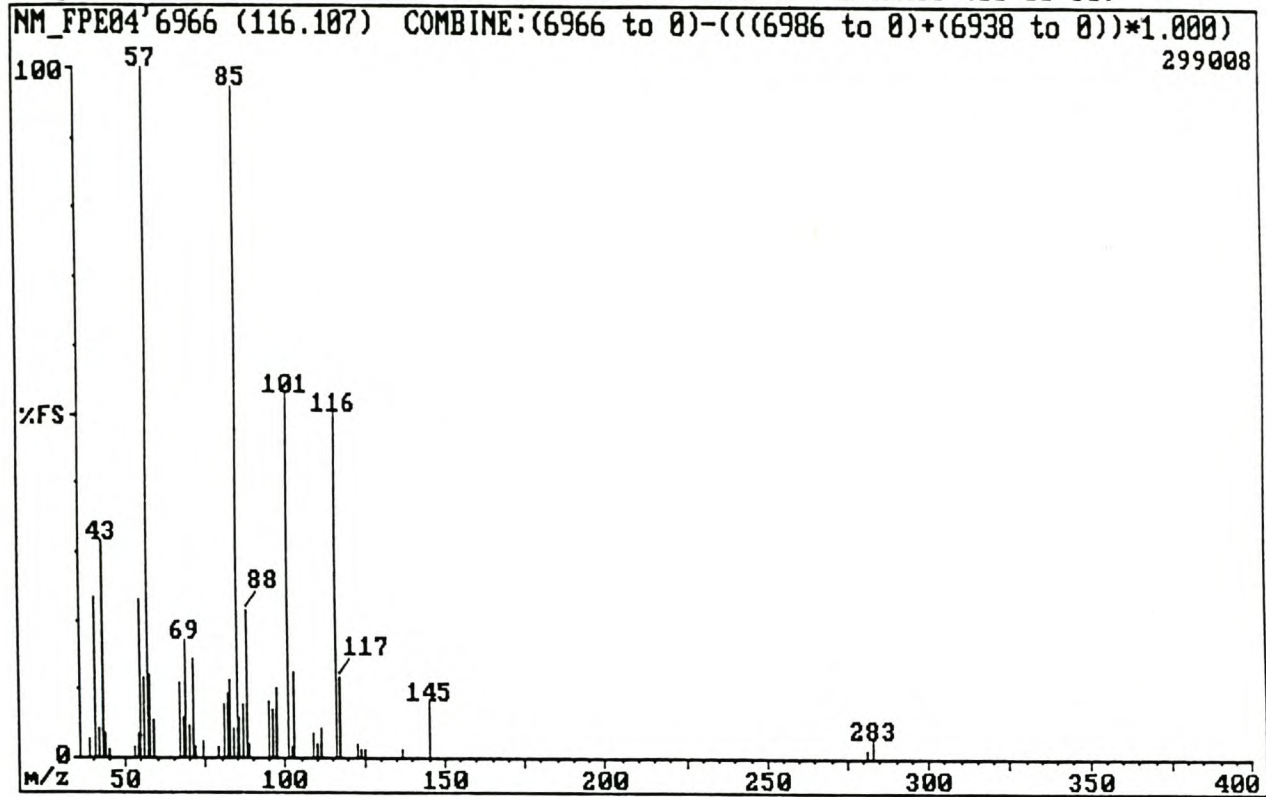
Figuur 2.17: EI-massaspektrum van komponent 7599 [2-Hidroksitrikos-1-ielbutanoaat].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



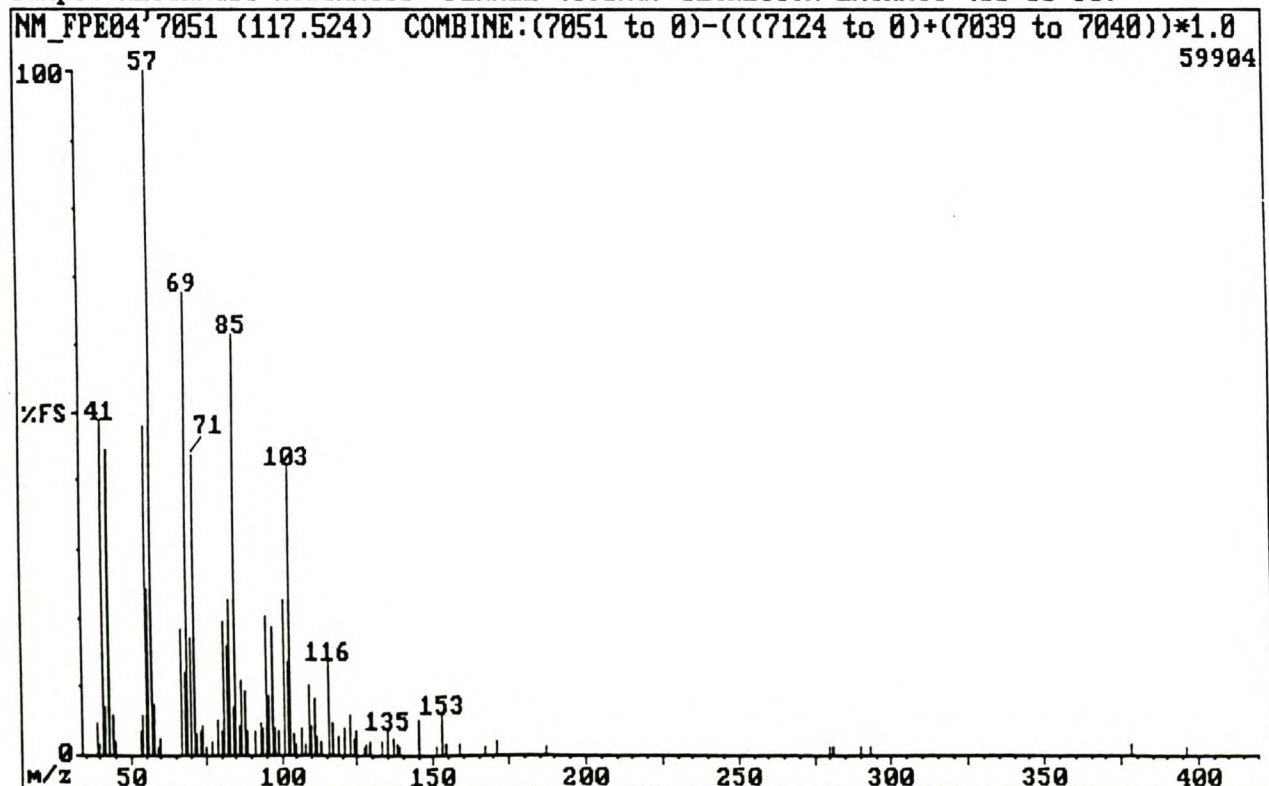
Figuur 2.18: EI-massaspektrum van komponent 6907 [1-Hidroksiikos-2-ielpentanoaat].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



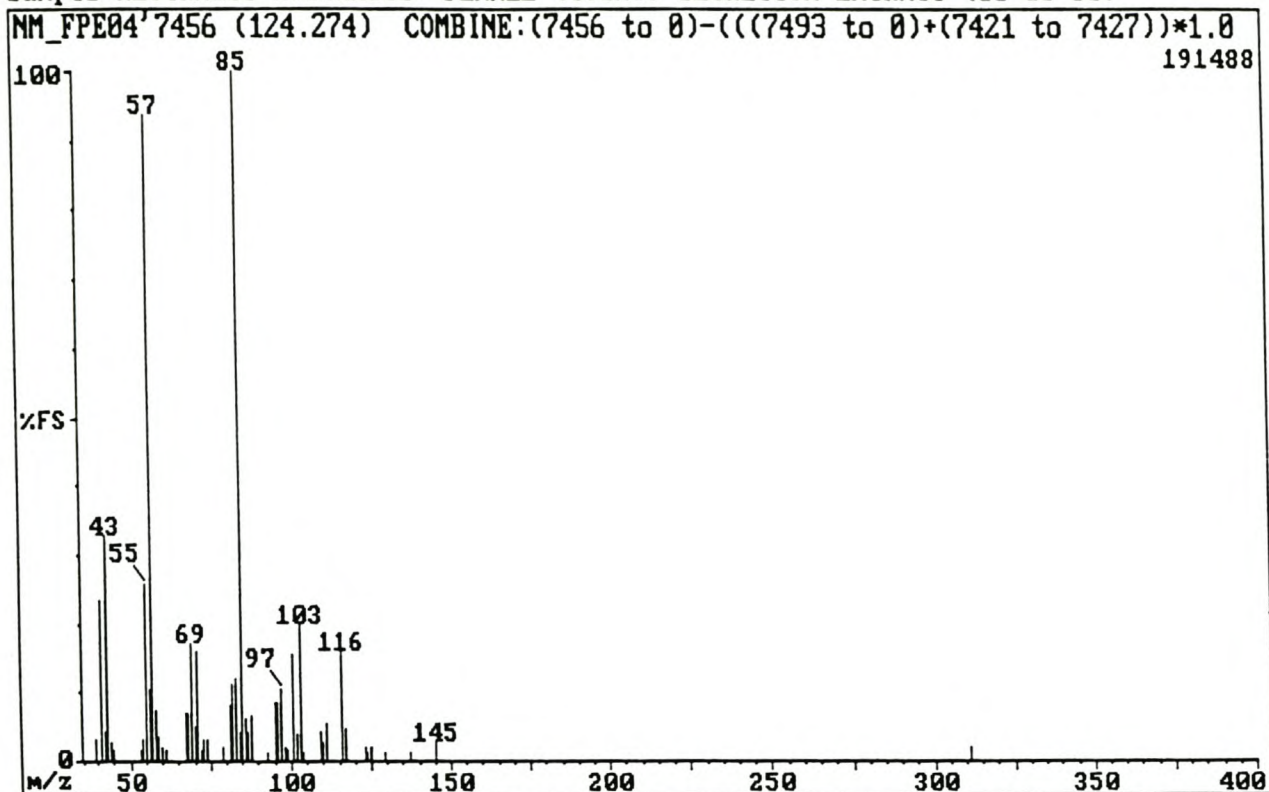
Figuur 2.19: EI-massaspektrum van komponent 6966 [2-Hidroksiïkos-1-ielpentanoaat].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



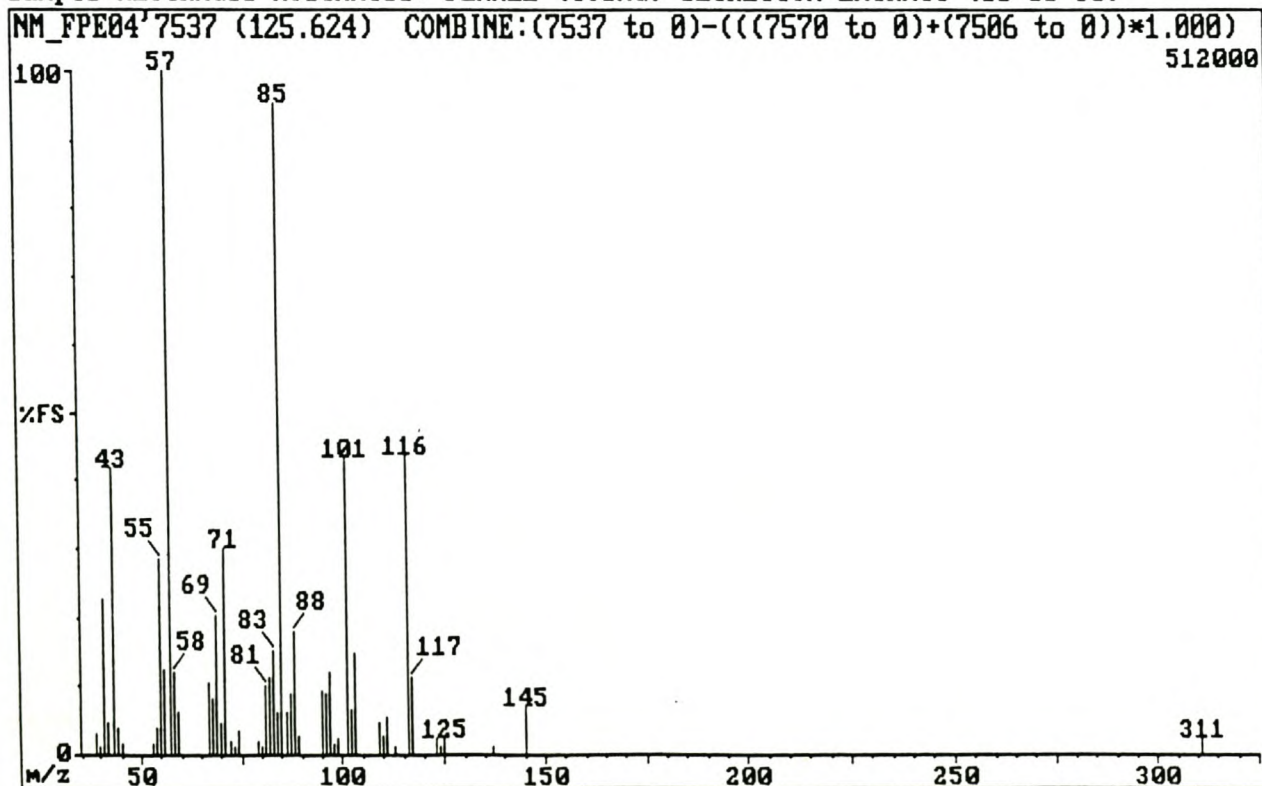
Figuur 2.20: EI-massaspektrum van komponent 7052 [Onversadigde hidroksipentanoaat].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



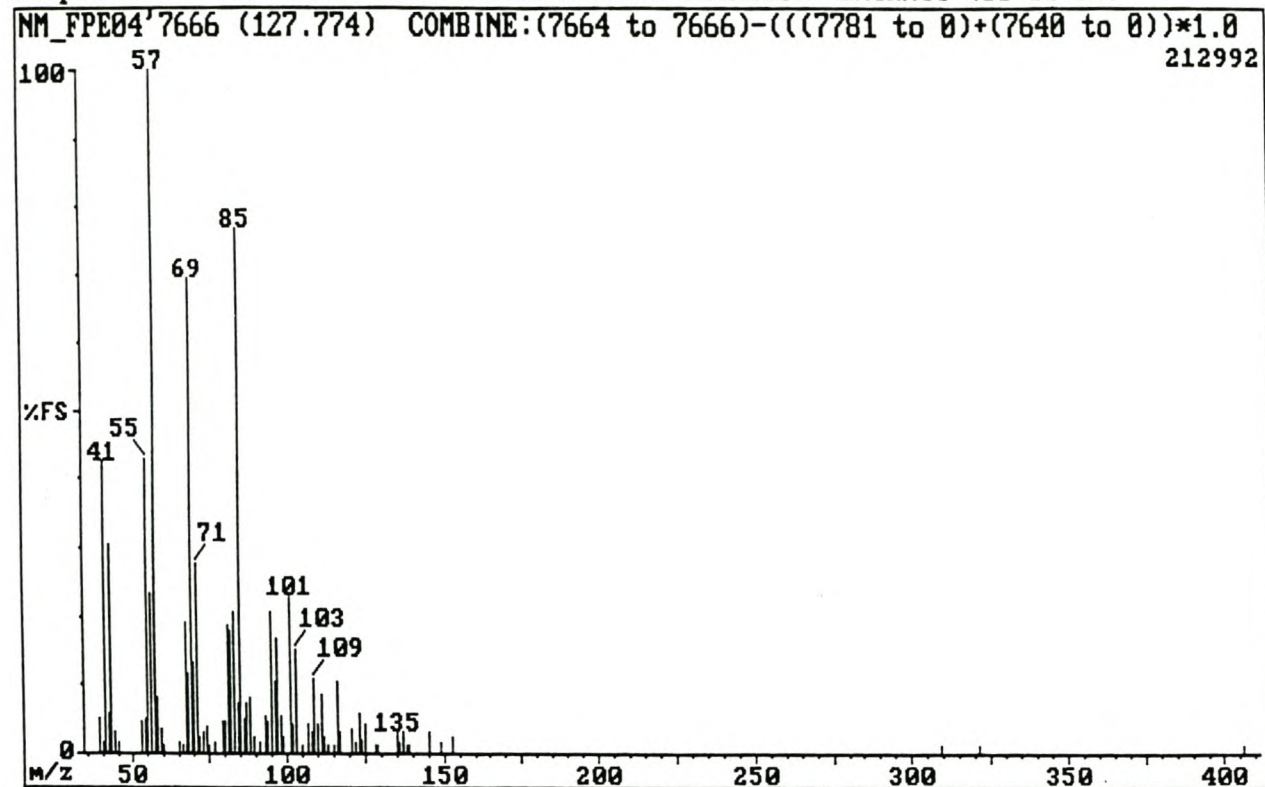
Figuur 2.21: El-massaspektrum van komponent 7456 [1-Hidroksidokos-2-ielpentanoaat].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



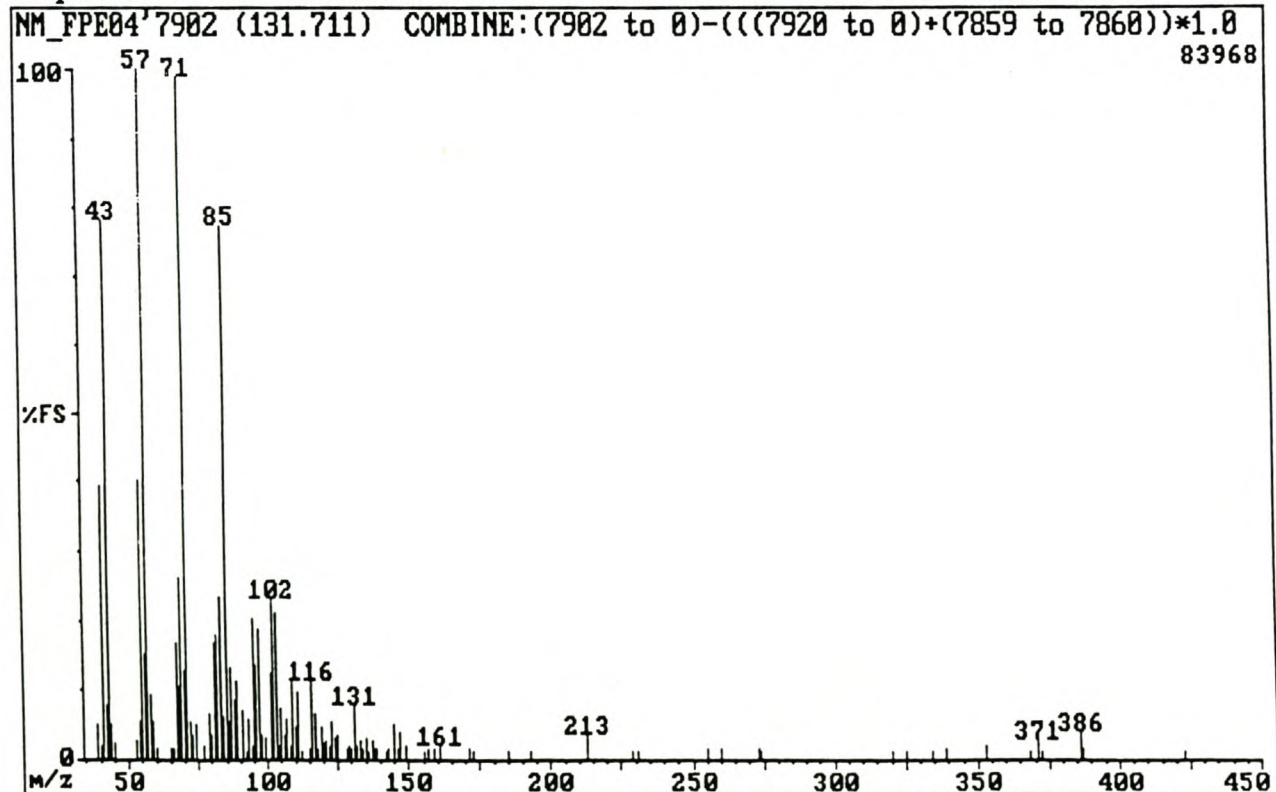
Figuur 2.22: El-massaspektrum van komponent 7537 [2-Hidroksidokos-1-ielpentanoaat].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



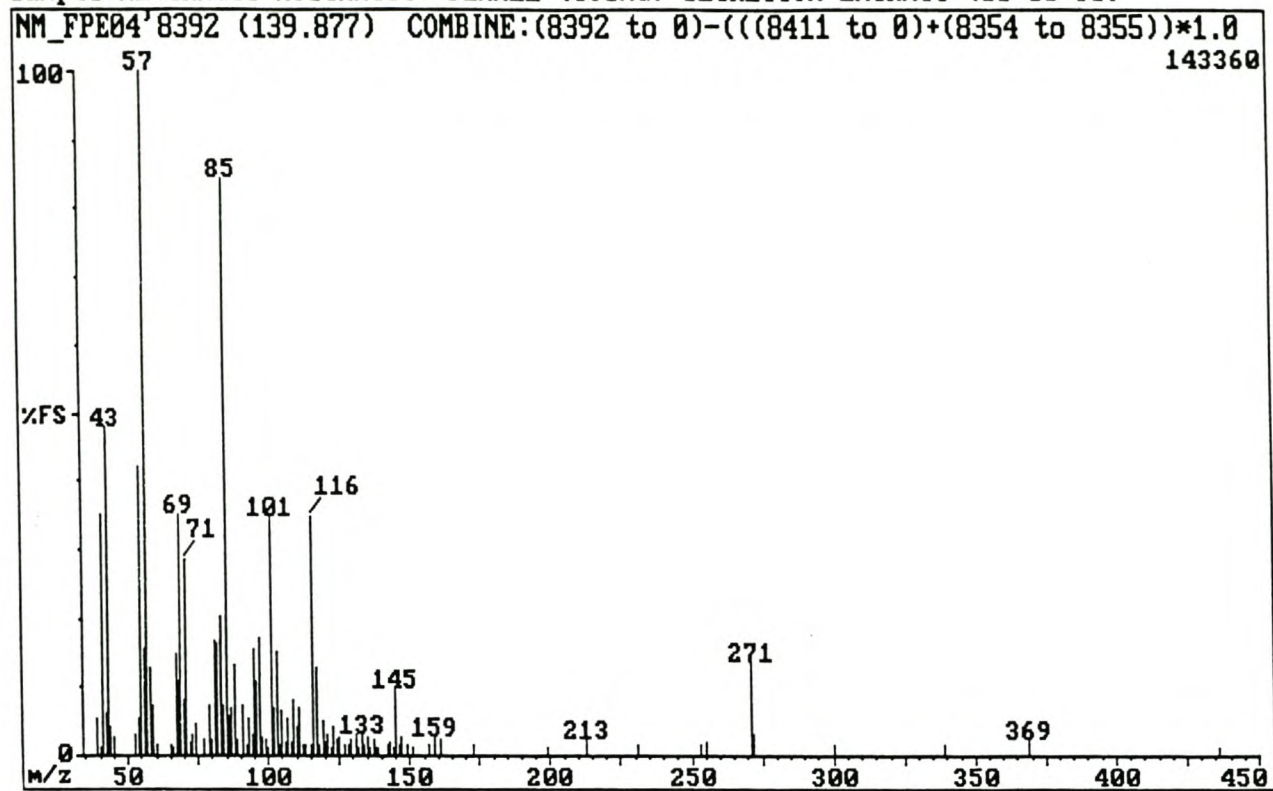
Figuur 2.23: El-massaspektrum van komponent 7667 [Onversadigde hidroksipentanoaat].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



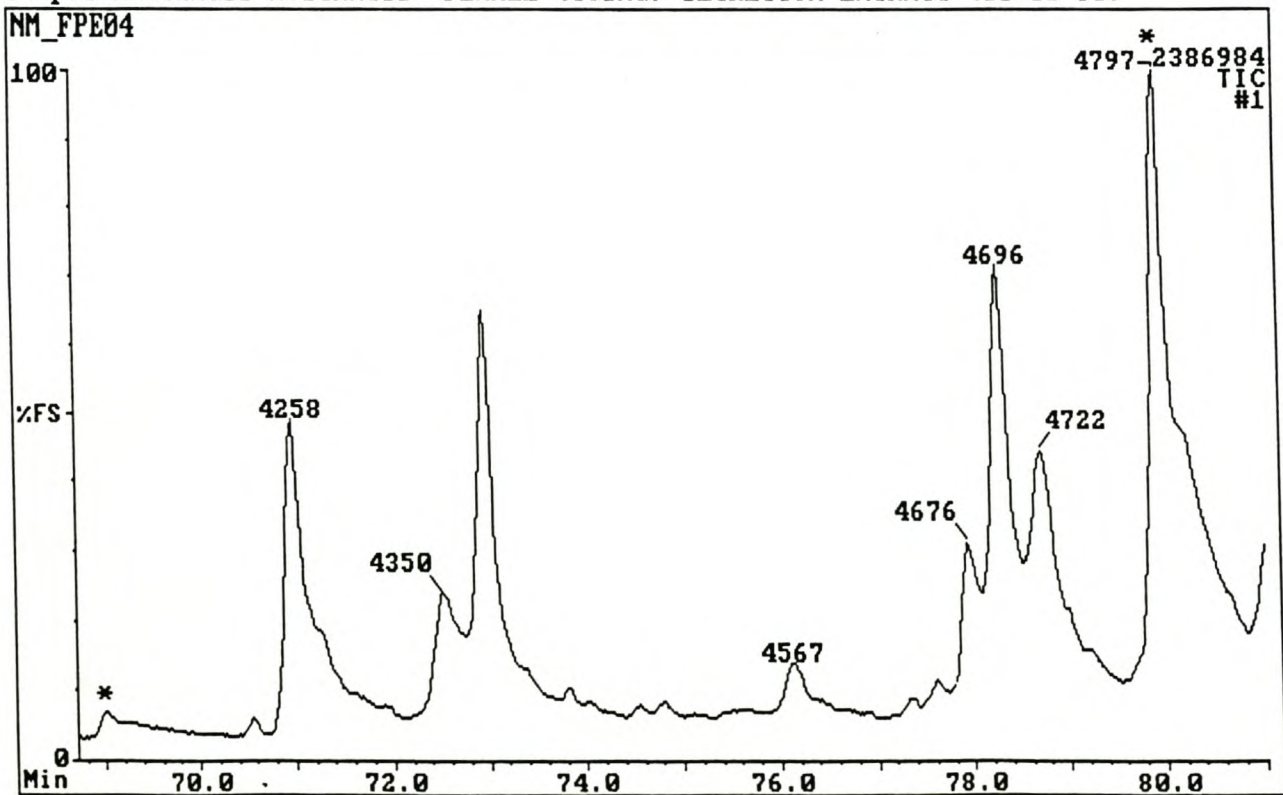
Figuur 2.24: El-massaspektrum van komponent 7902 [2-Hidroksitrikos-1-ielpenanoaat].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



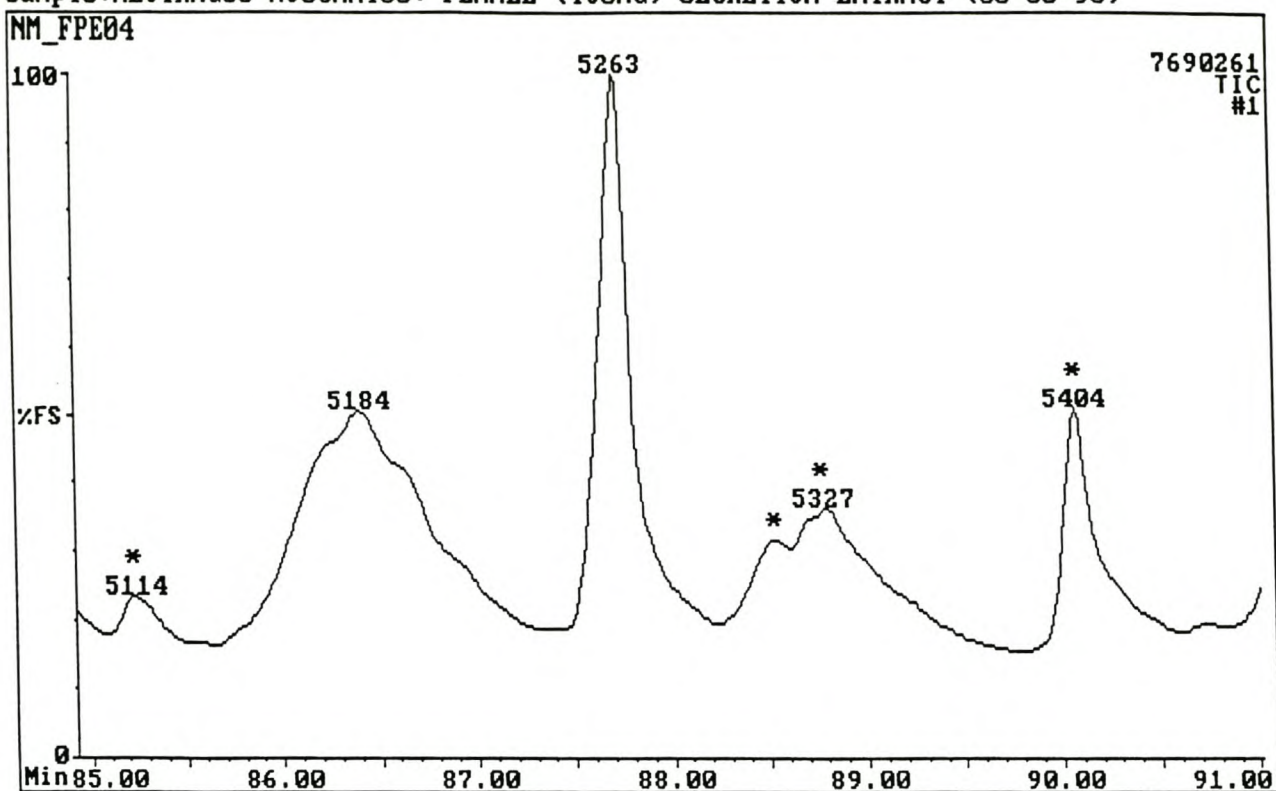
Figuur 2.25: El-massaspektrum van komponent 8391 [2-Hidroksitetraokos-1-ielpentanoaat].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



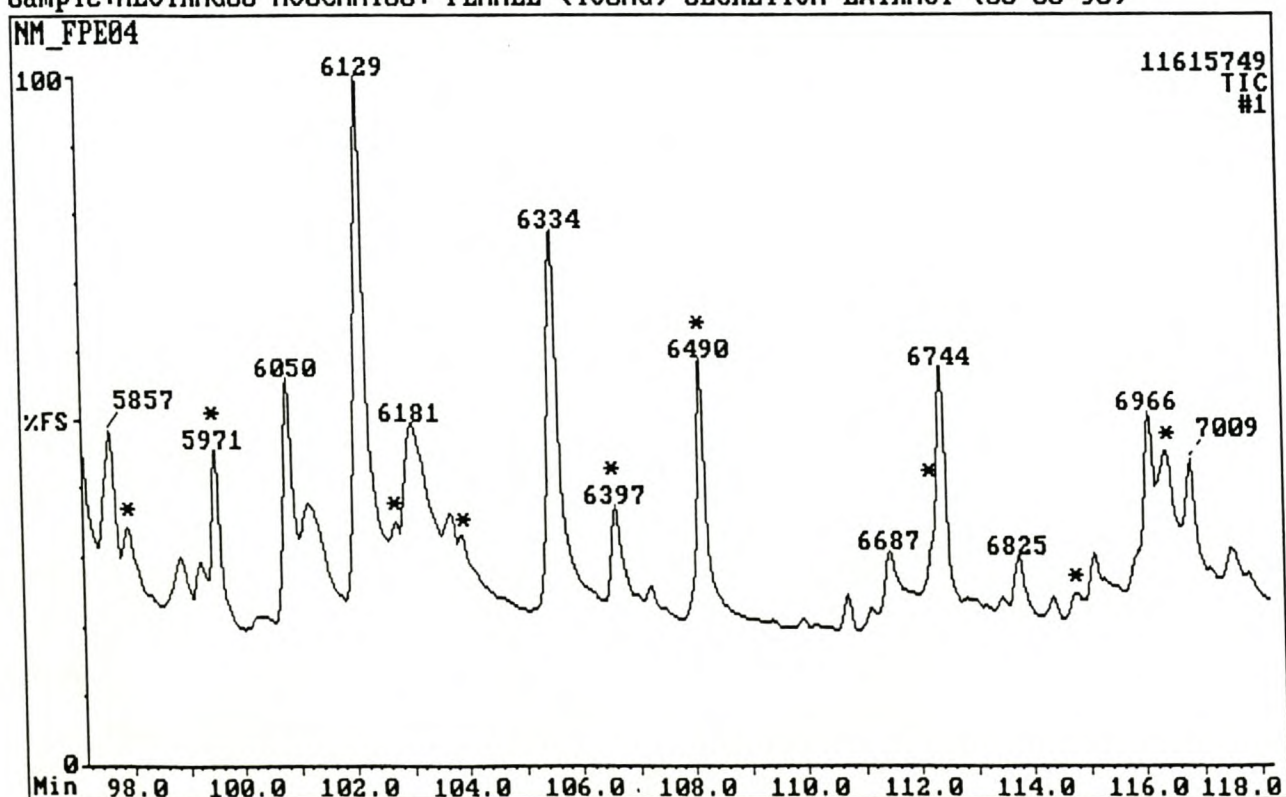
Figuur 2.26a: TIC van die preorbitale afskeiding van die suni-ooi. Die karboksiesure is met * aangedui.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



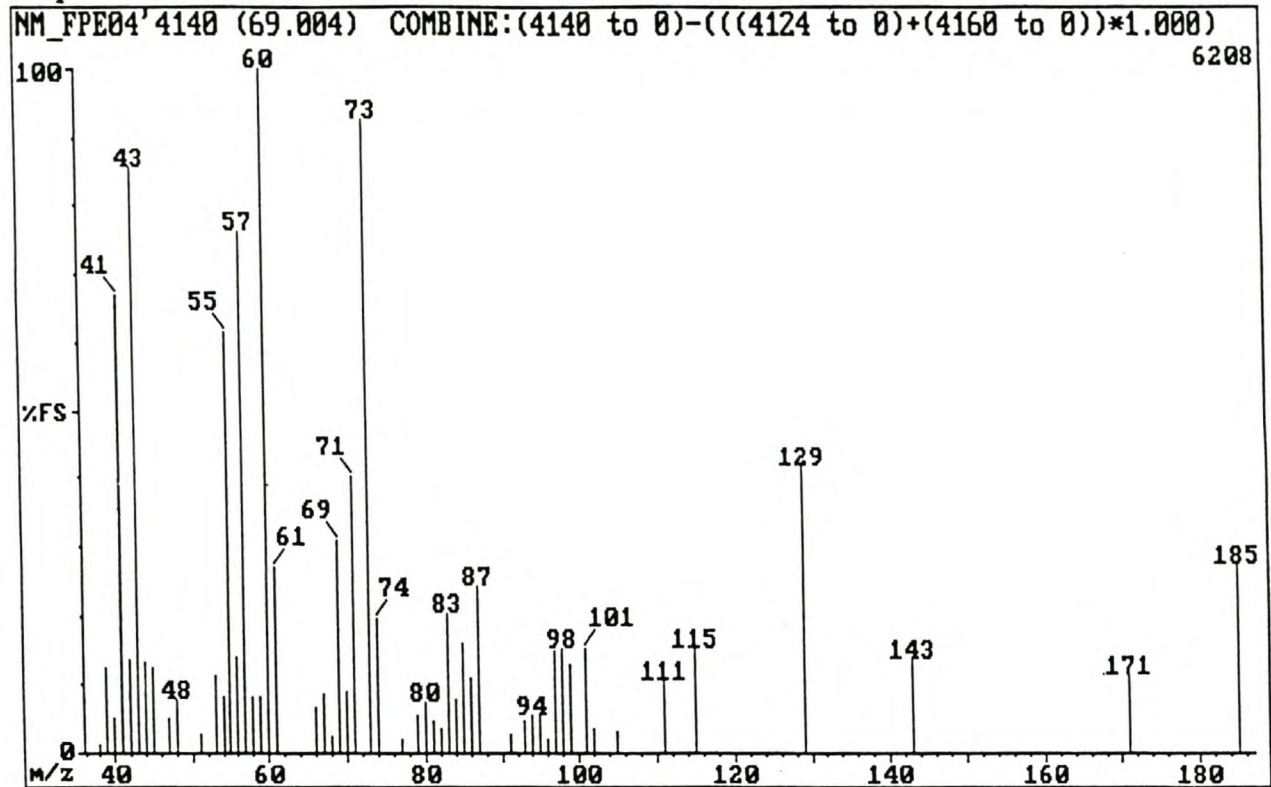
Figuur 2.26b: TIC van die preorbitale afseiding van die suni-ooi. Die karboksiesure is met * aangedui.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



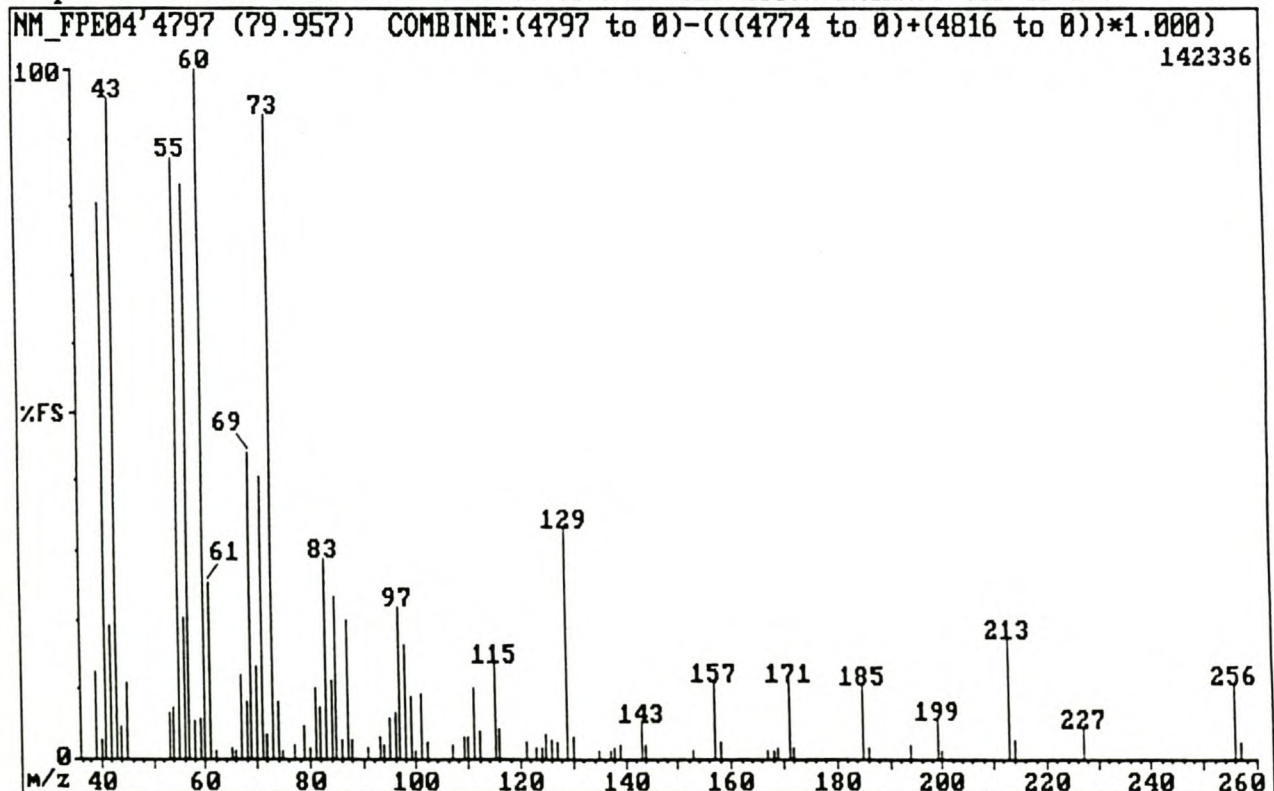
Figuur 2.26c: TIC van die preorbitale afseiding van die suni-ooi. Die karboksiesure is met * aangedui.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



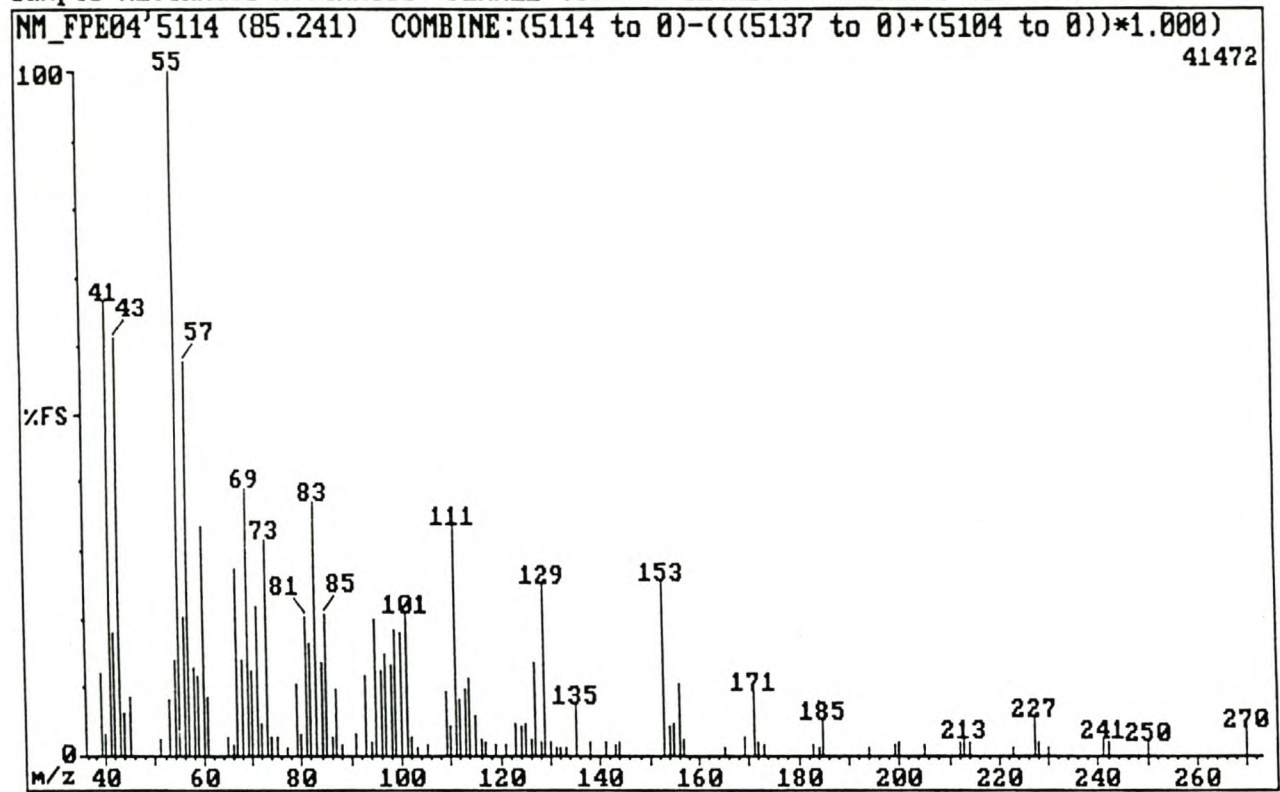
Figuur 2.27: EI-massaspektrum van komponent 4137 [Tetradekanoësuur].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



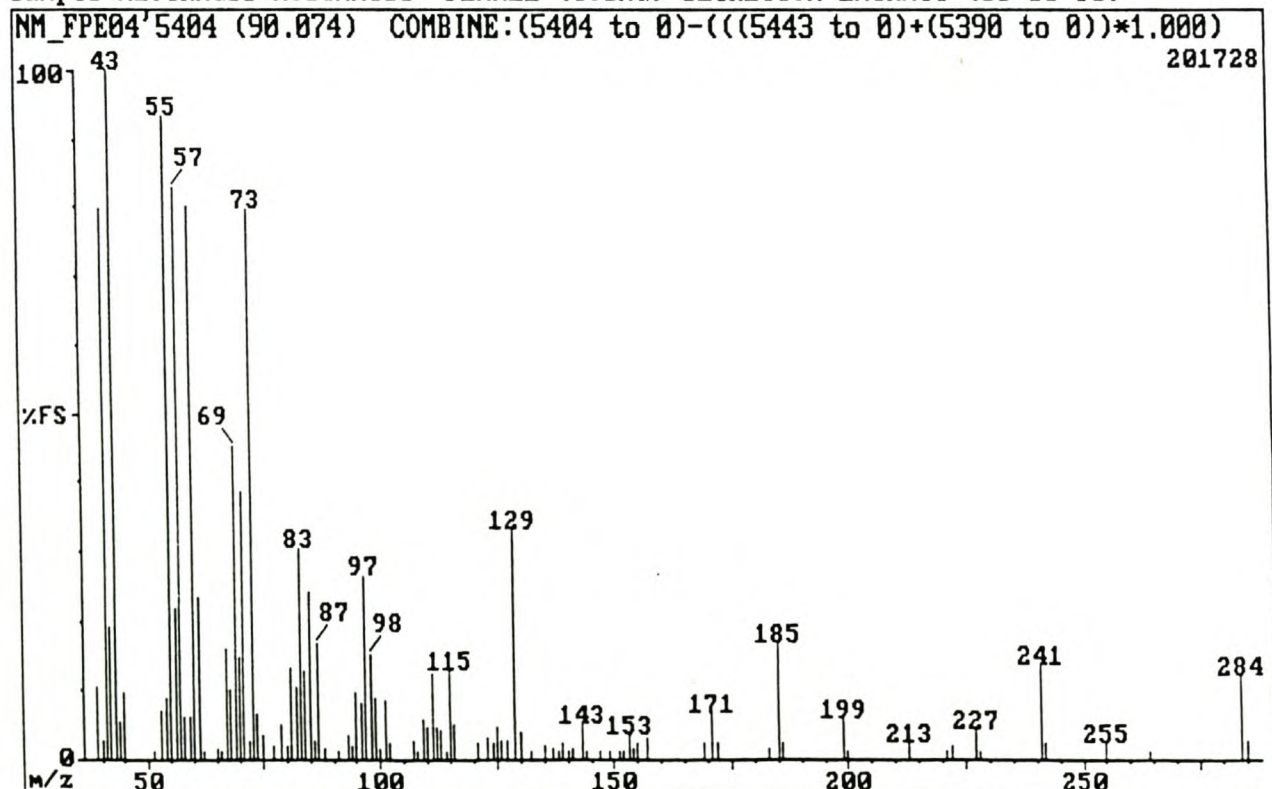
Figuur 2.28: EI-massaspektrum van komponent 4797 [Heksadekanoësuur].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



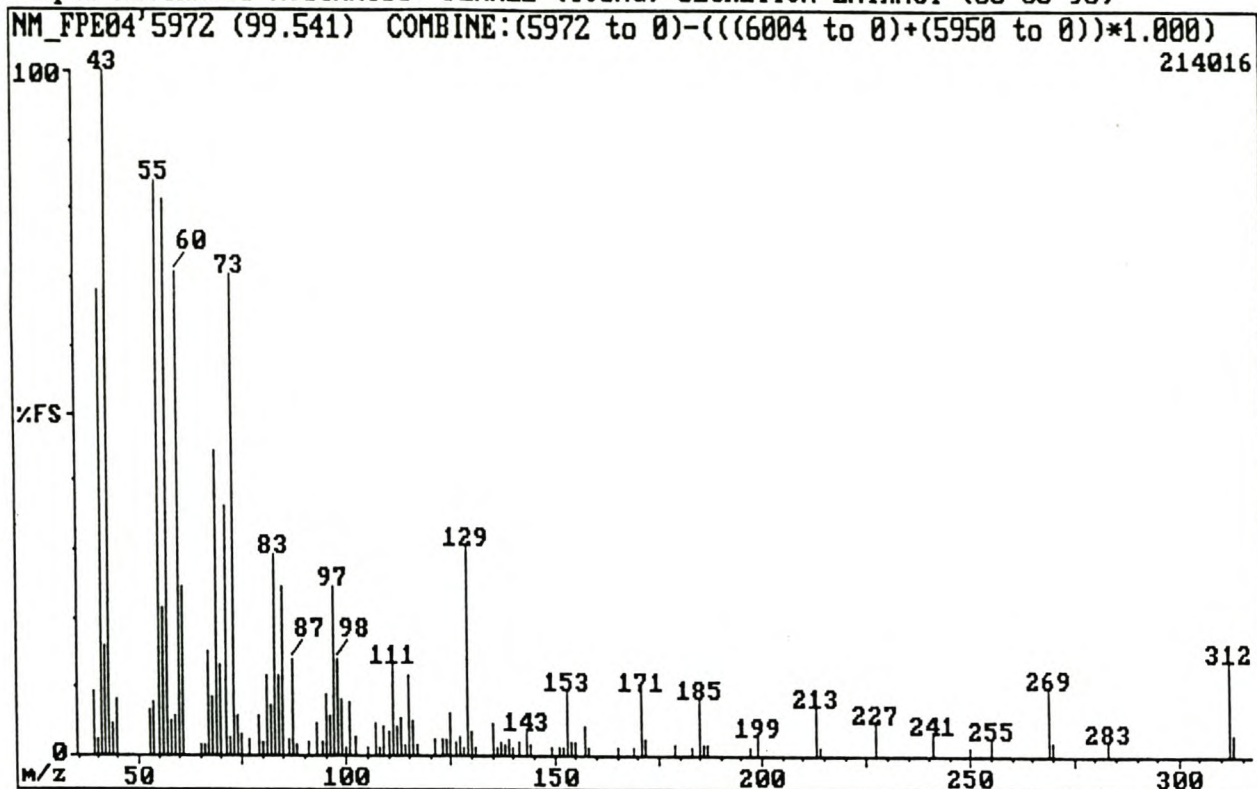
Figuur 2.29: EI-massaspektrum van komponent 5114 [Heptadekanoësuur].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



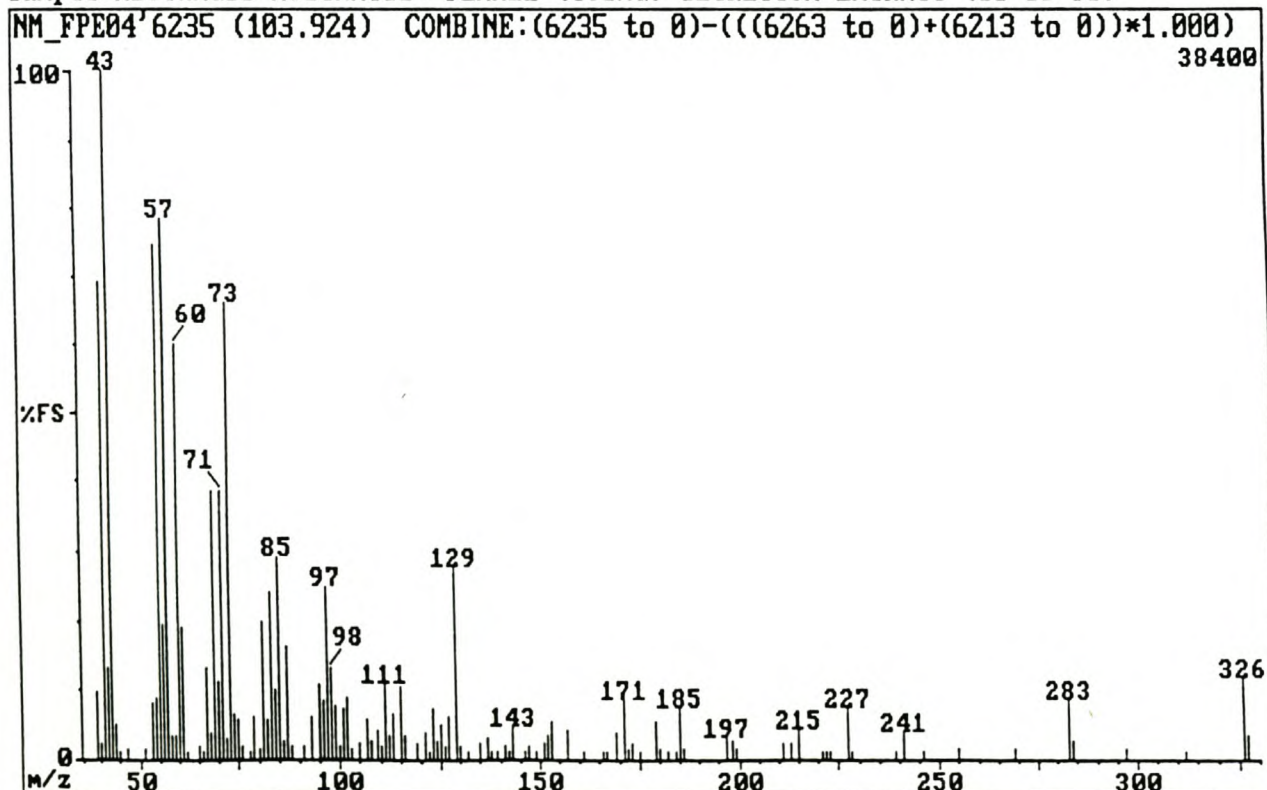
Figuur 2.30: EI-massaspektrum van komponent 5404 [Oktadekanoësuur].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



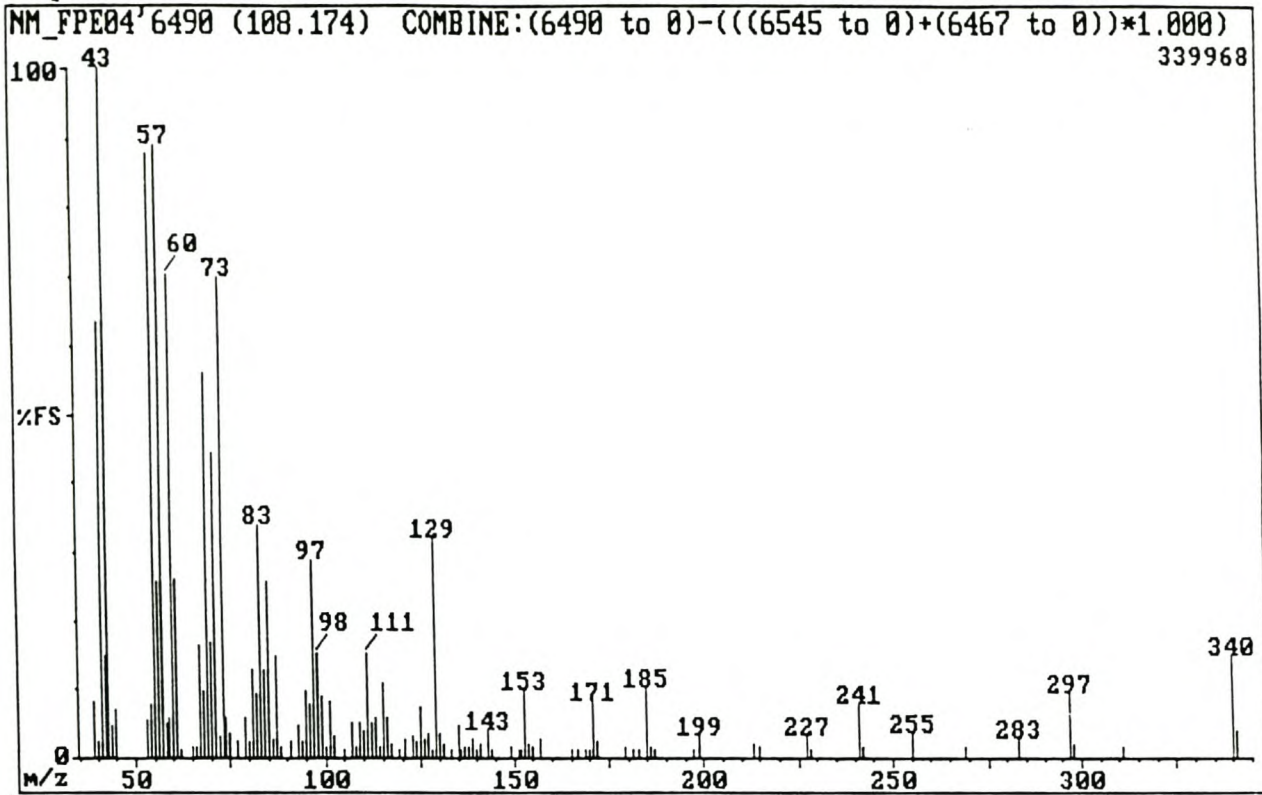
Figuur 2.31: EI-massaspektrum van komponent 5971 [Ikosanoësuur].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



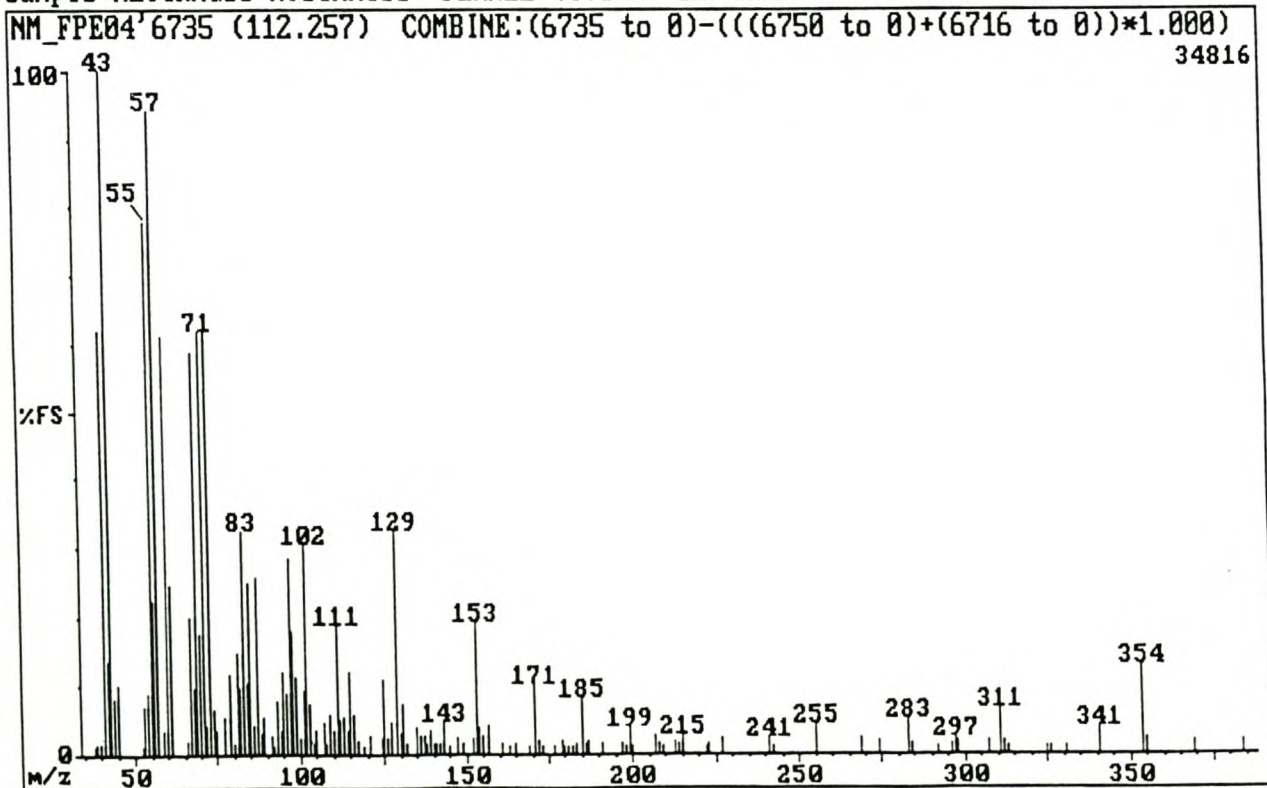
Figuur 2.32: EI-massaspektrum van komponent 6235 [Henikosanoësuur].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



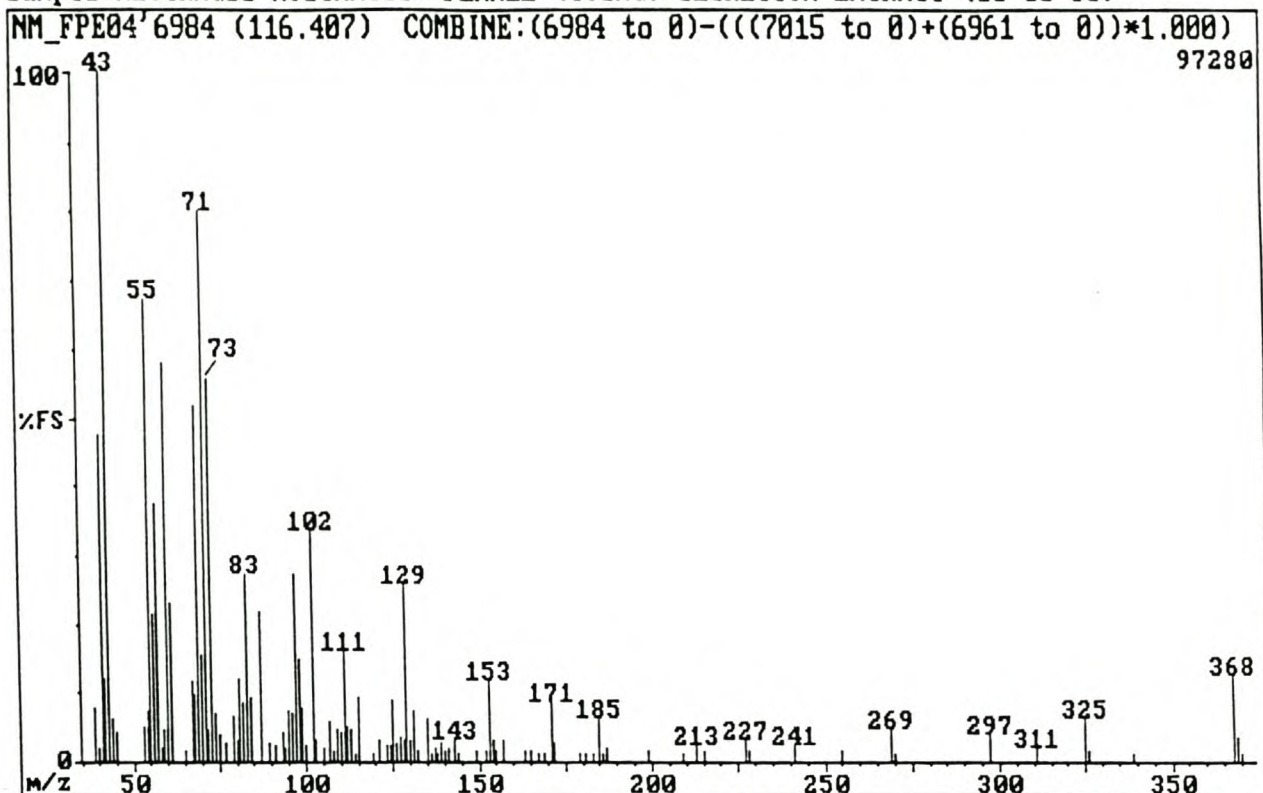
Figuur 2.33: EI-massaspektrum van komponent 6490 [Dokosanoësuur].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



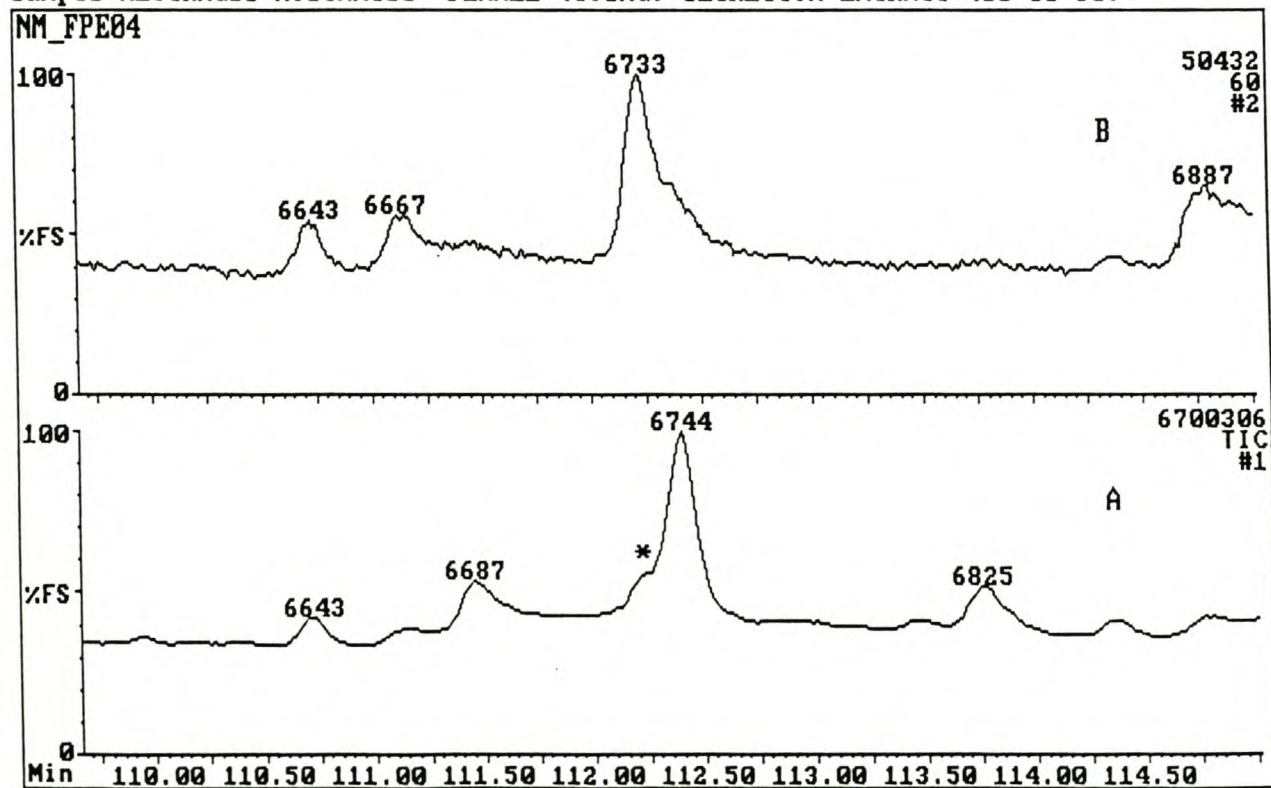
Figuur 2.34: EI-massaspektrum van komponent 6733 [Trikosanoësuur].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



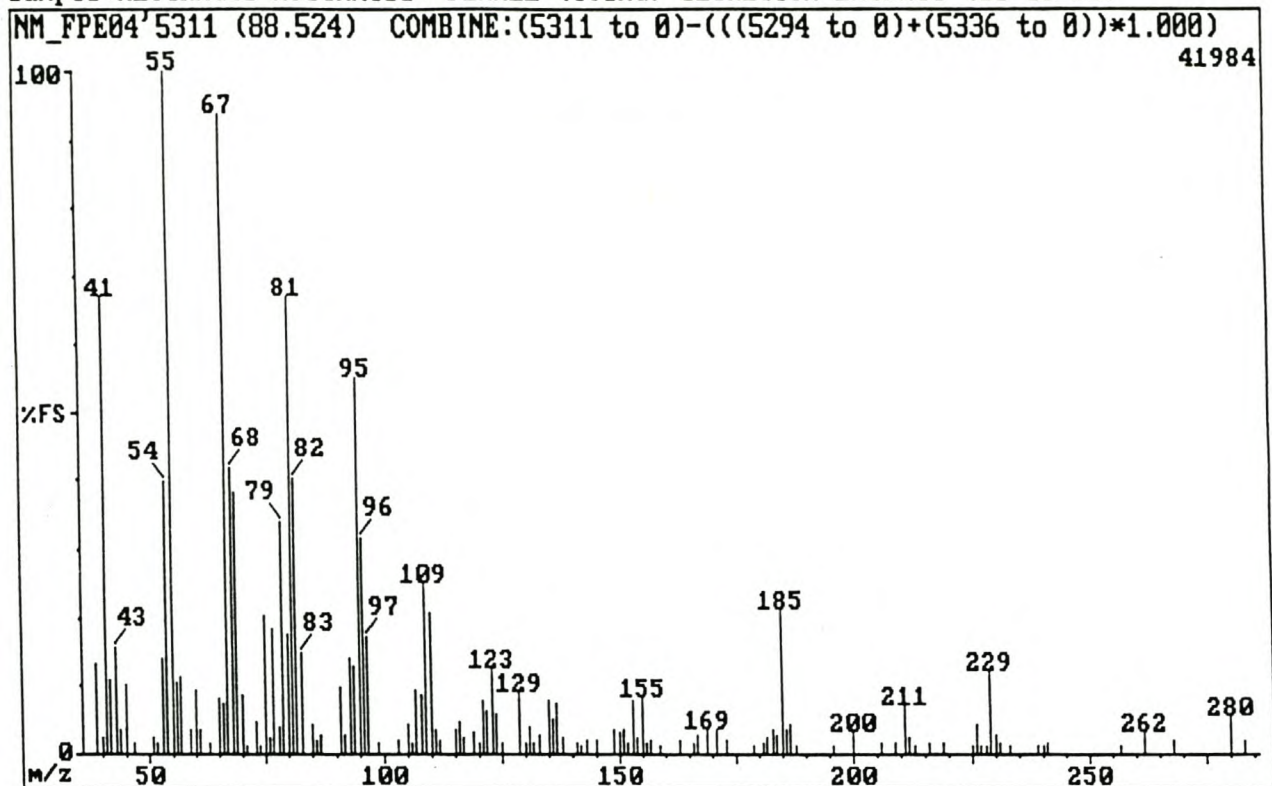
Figuur 2.35: EI-massaspektrum van komponent 6984 [Tetrakosanoësuur].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



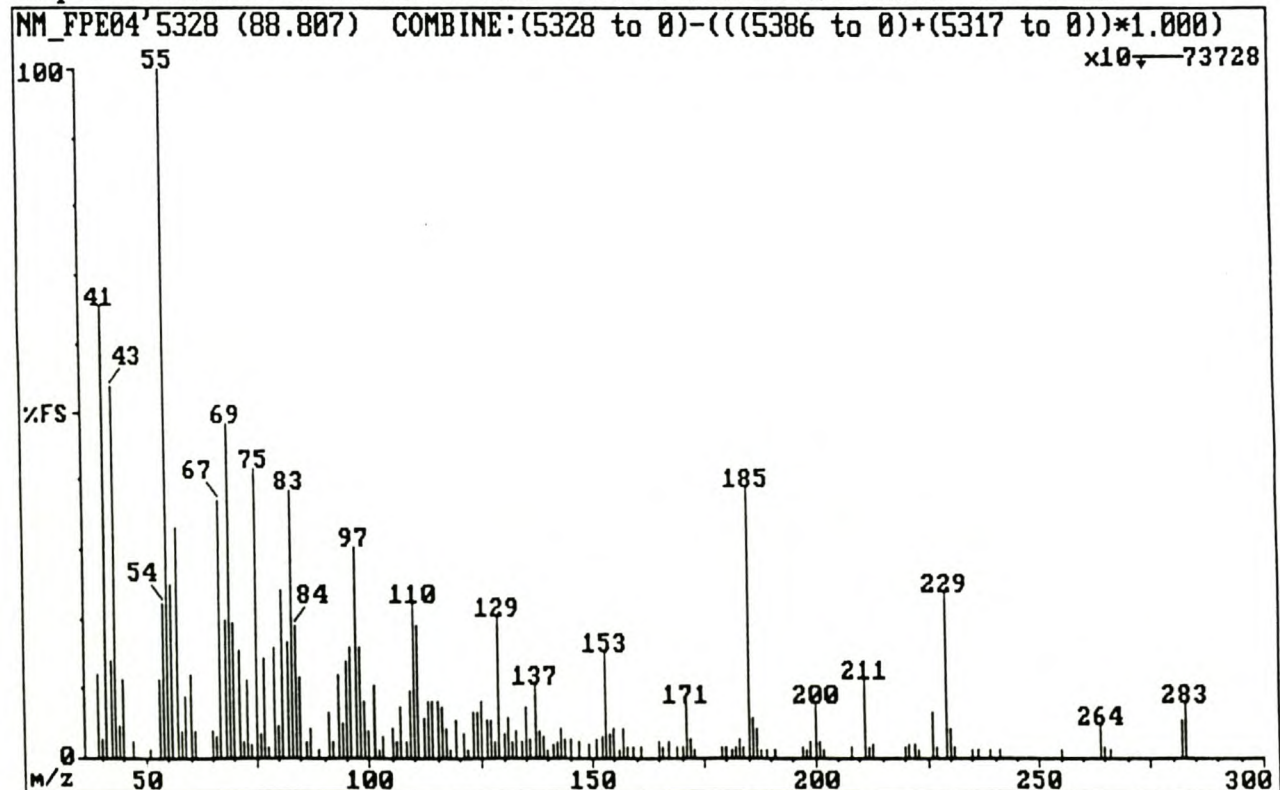
Figuur 2.36: Die TIC (A) en enkel-ioonstroomchromatogram vir die ion m/z 60 (B), waaruit blyk dat komponent 6733 feitlik slegs as skouer van 'n groter piek waarneembaar is.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



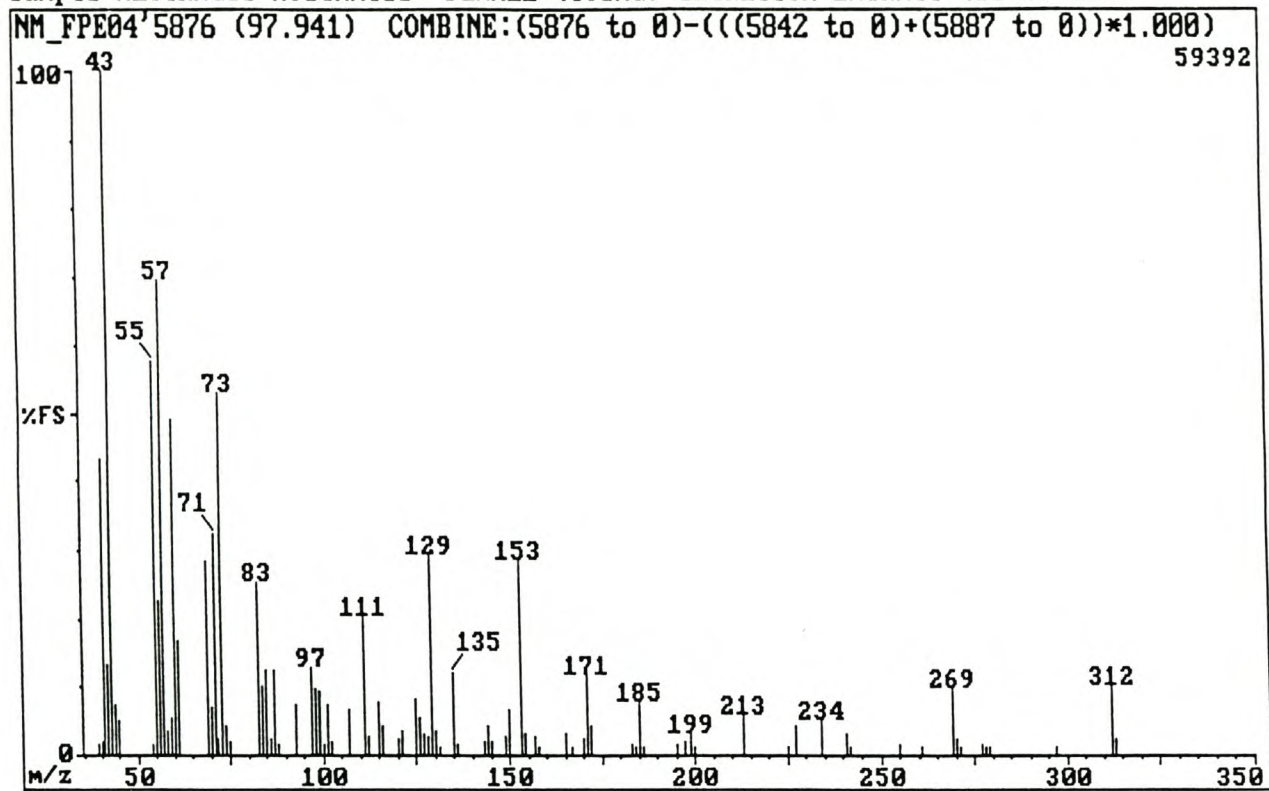
Figuur 2.37: EI-massaspektrum van komponent 5311 [(9Z, 12Z)-Oktadekadiënoësuur].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



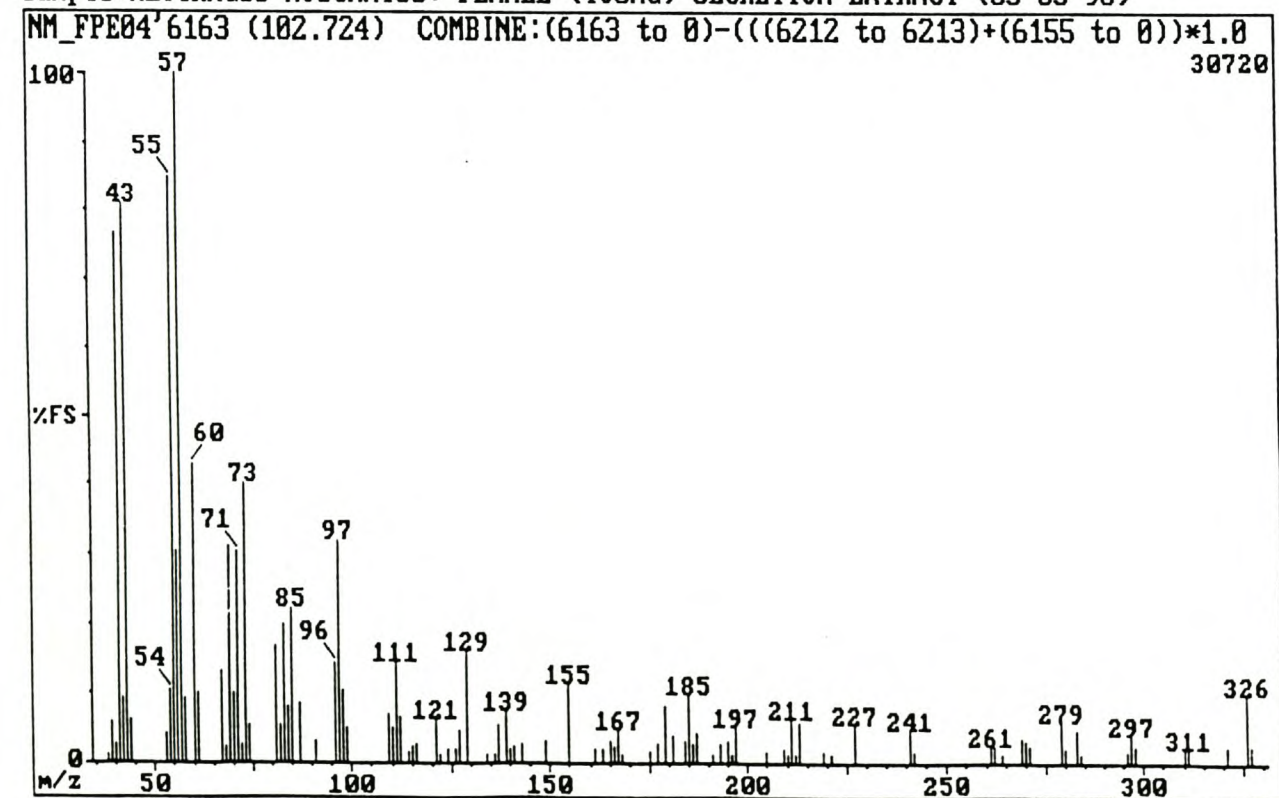
Figuur 2.38: EI-massaspektrum van komponent 5327 [(Z)-9-Oktadekenoësuur].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



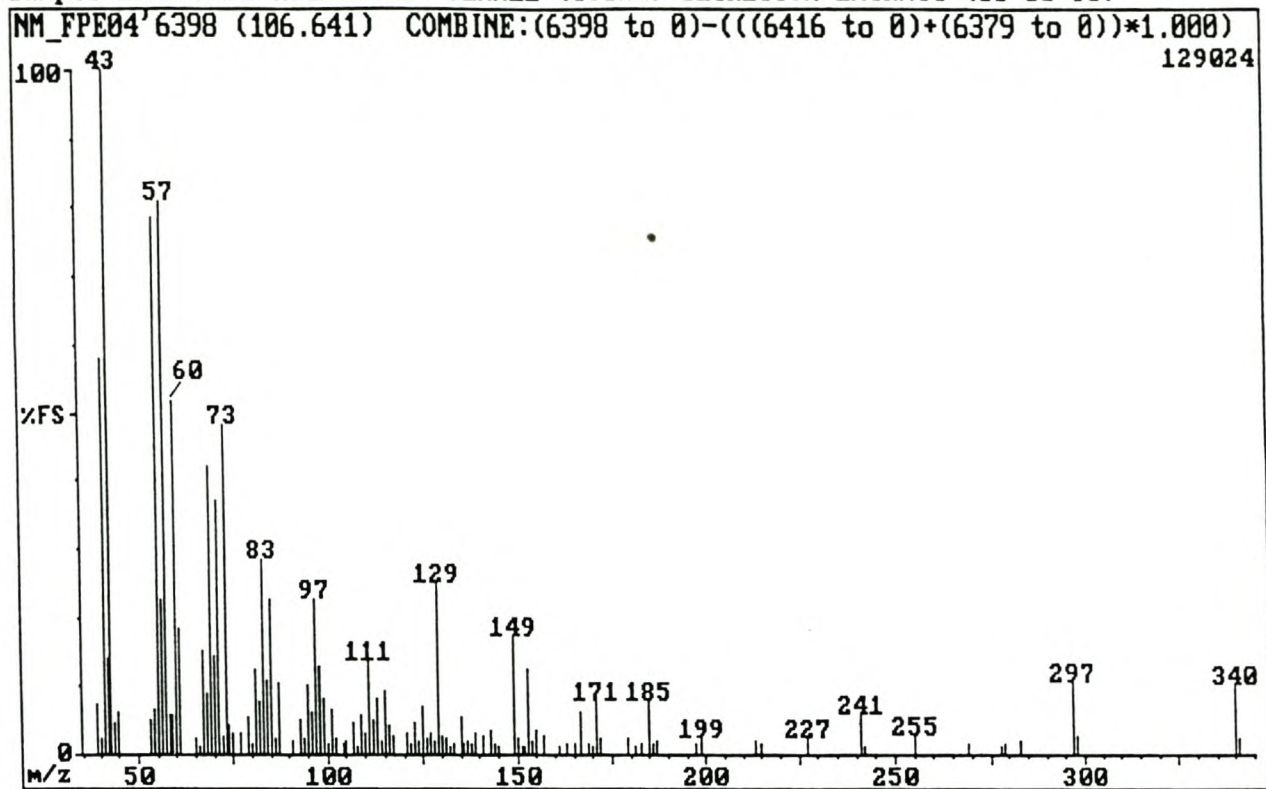
Figuur 2.39: EI-massaspektrum van komponent 5876 [18-Metielnonadekanoësuur].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



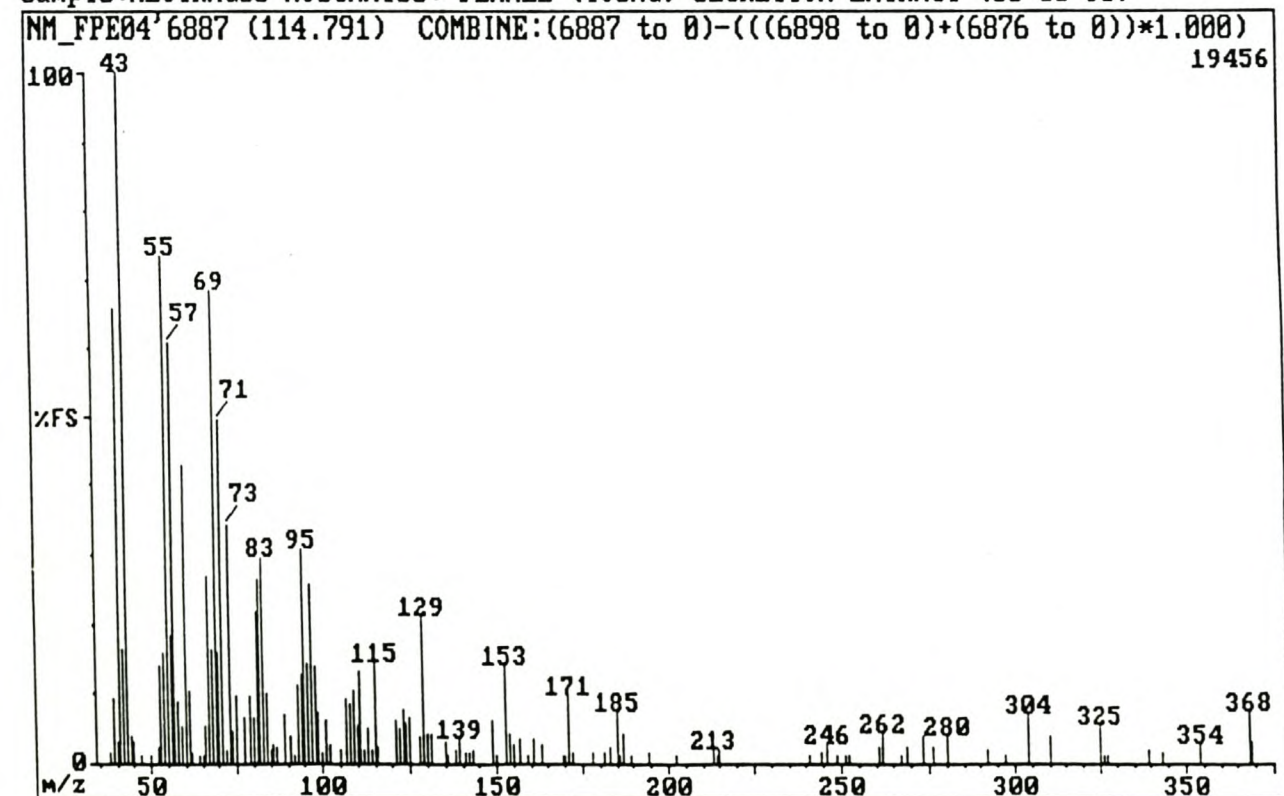
Figuur 2.40: EI-massaspektrum van komponent 6163 [19-Metielikosanoësuur].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)

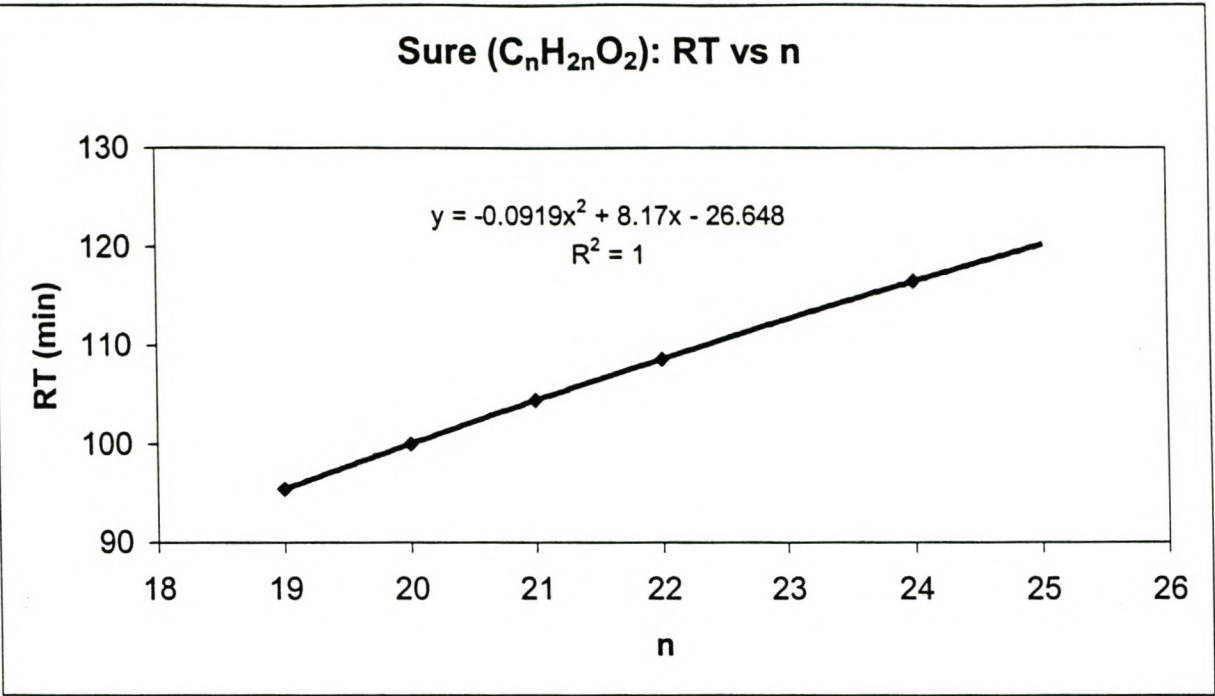


Figuur 2.41: EI-massaspektrum van komponent 6397 [20-Henikosanoësuur].

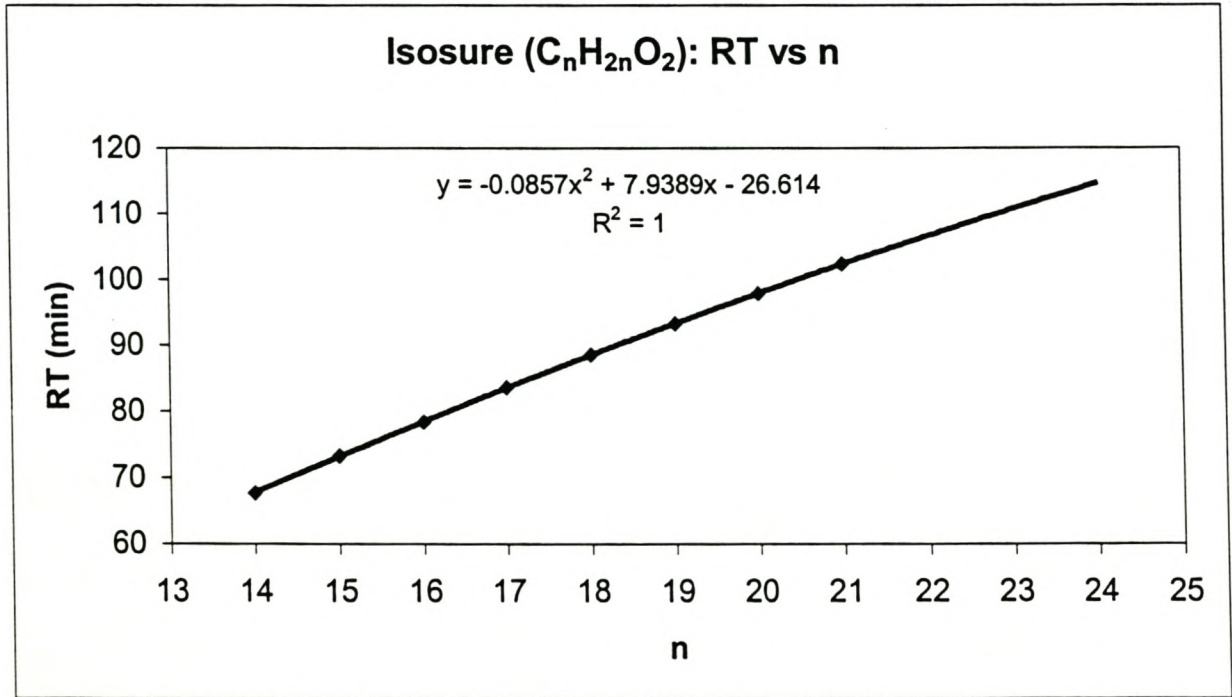
Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



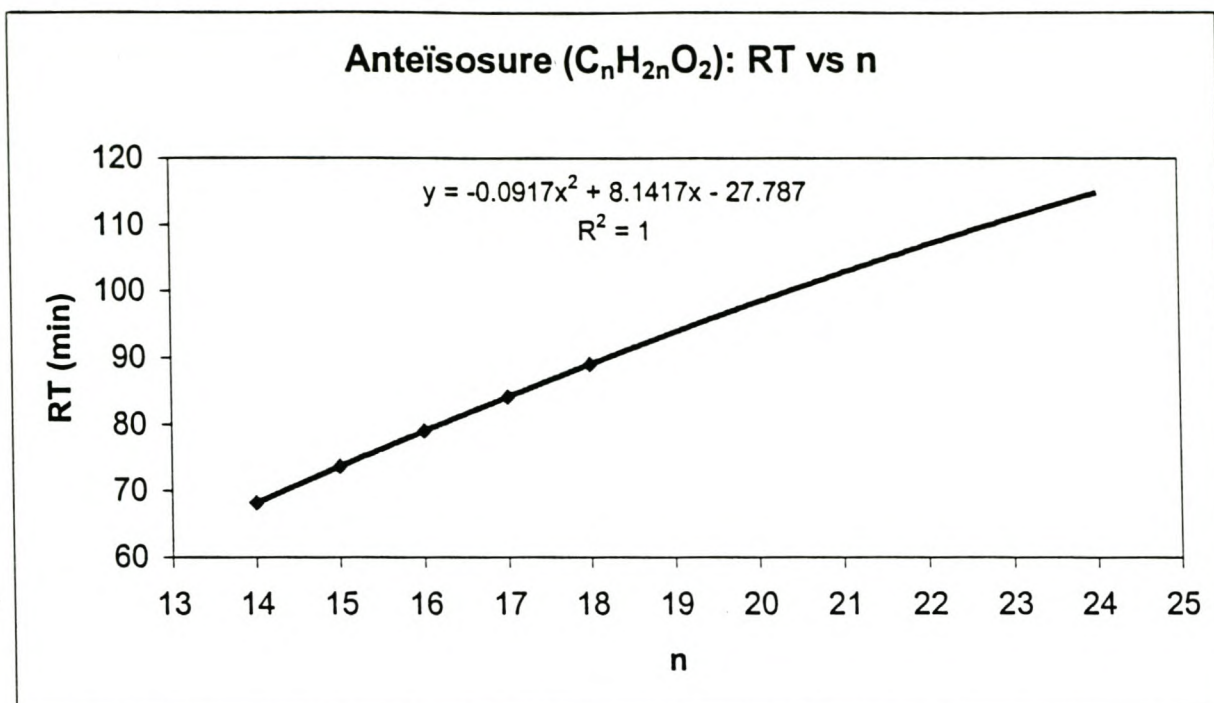
Figuur 2.42: EI-massaspektrum van komponent 6888 [22-Metieltrikosanoësuur].



Figuur 2.43: Kalibrasiekurwe vir normaalsure RT vs n

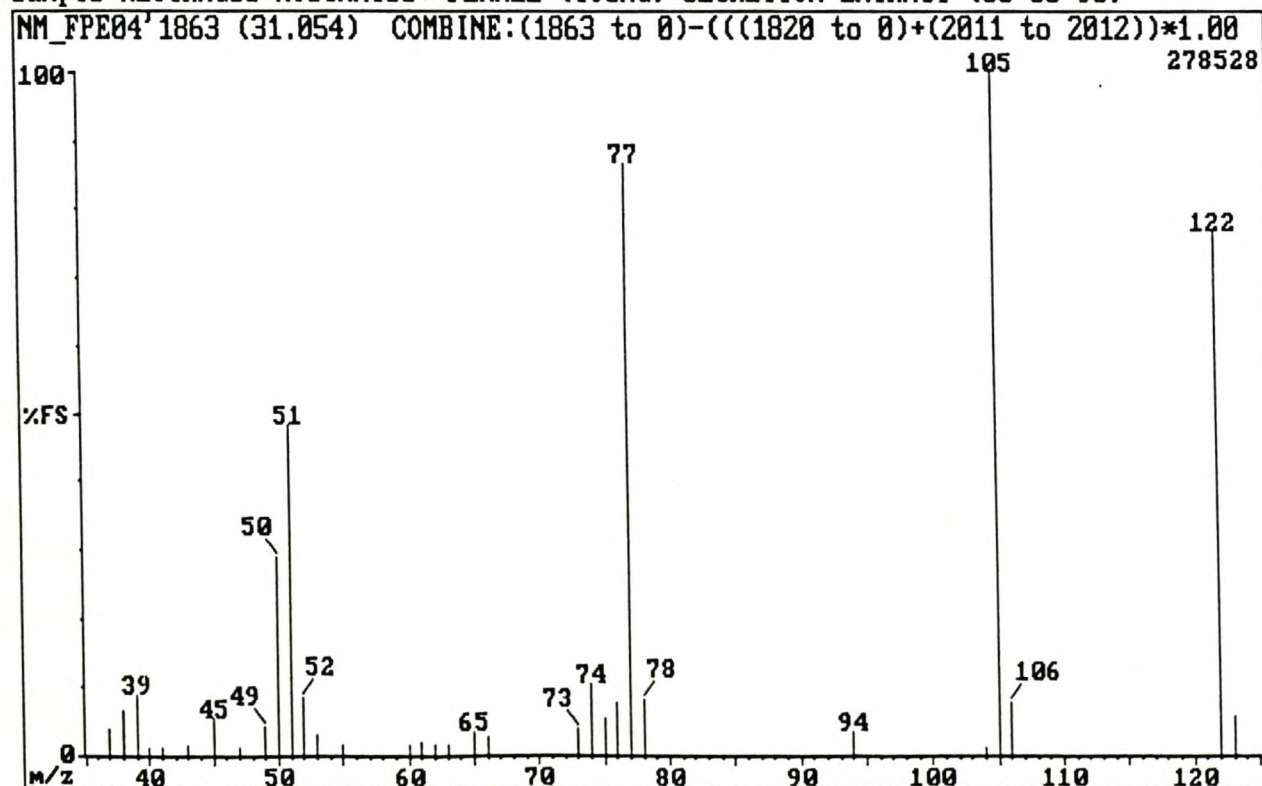


Figuur 2.44: Kalibrasiegrafiek vir iso-sure.



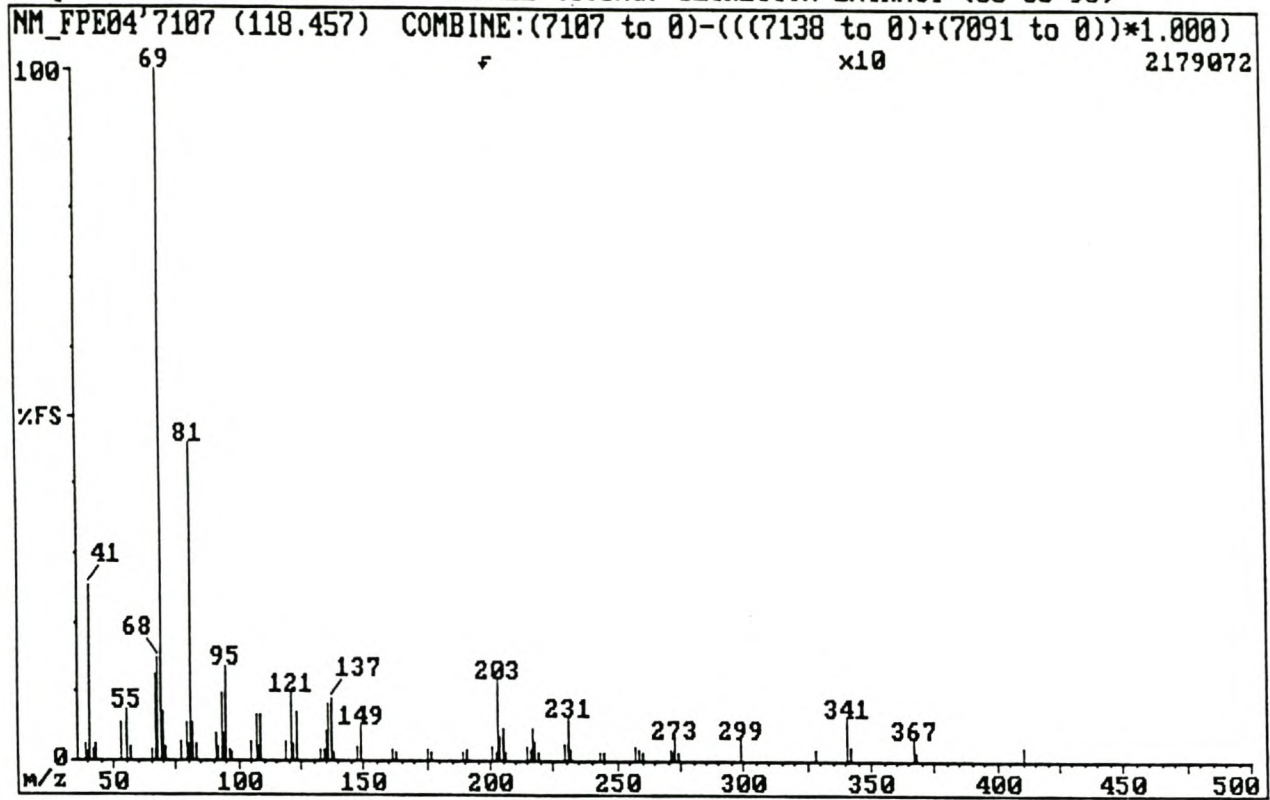
Figuur 2.45: Kalibrasiegrafiek vir die anteïso-sure.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



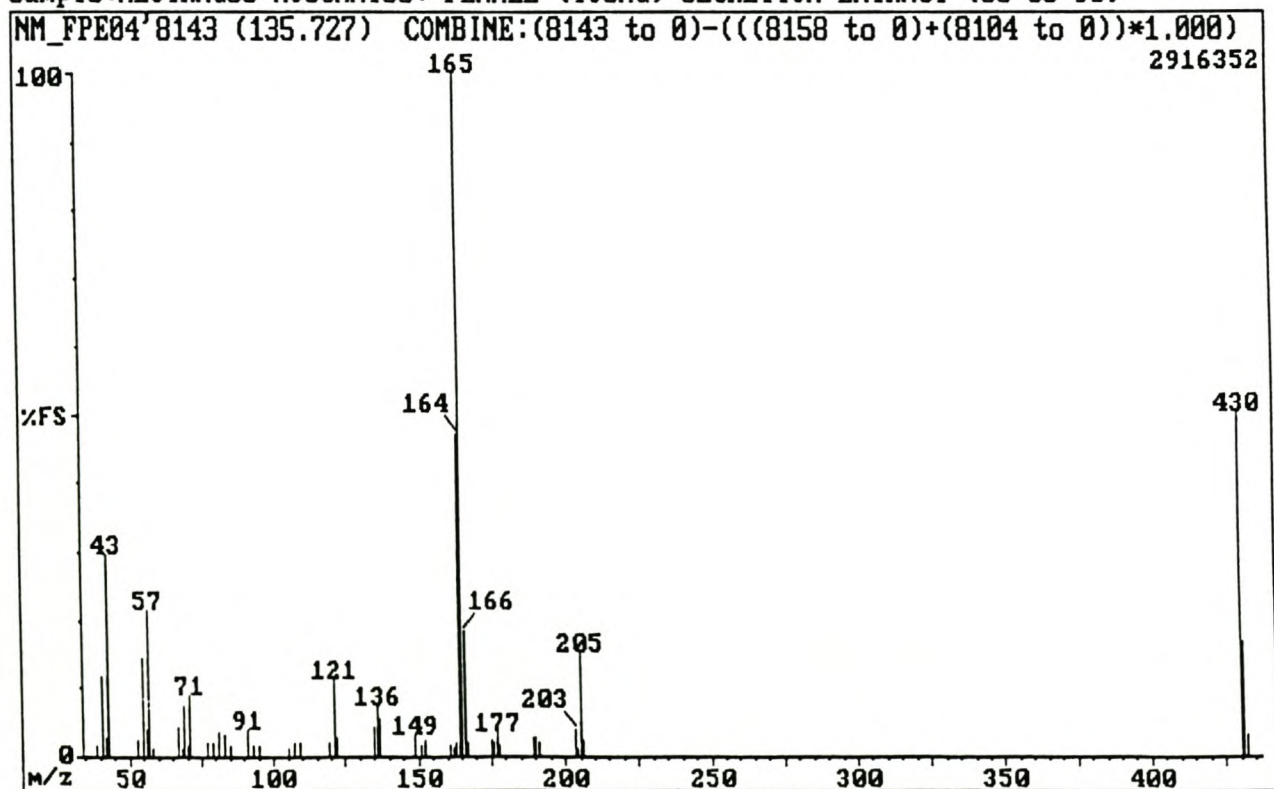
Figuur 2.46: EI-massaspektrum van komponent 1863 [Bensoësuur].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



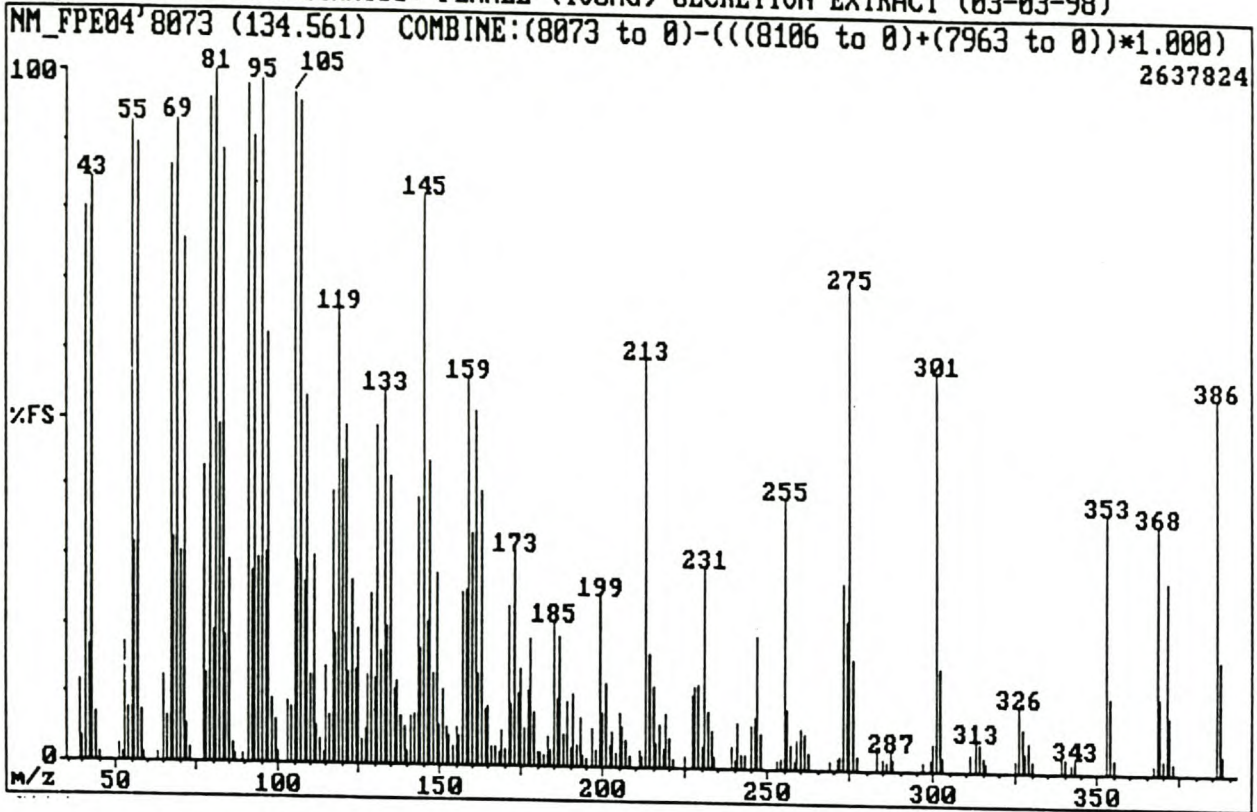
Figuur 2.47: EI-massaspektrum van komponent 7107 [Skwaleen].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



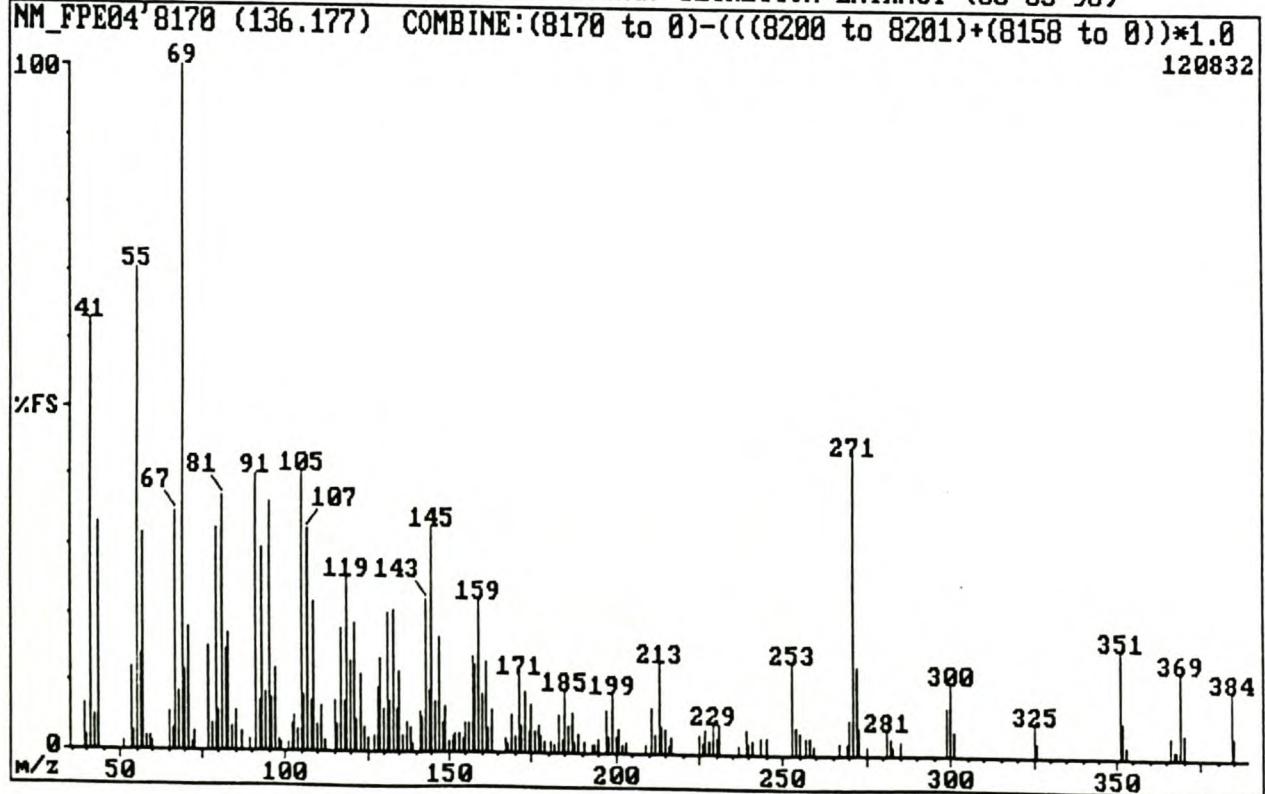
Figuur 2.48: EI-massaspektrum van komponent 8142 [α -Tokoferol].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



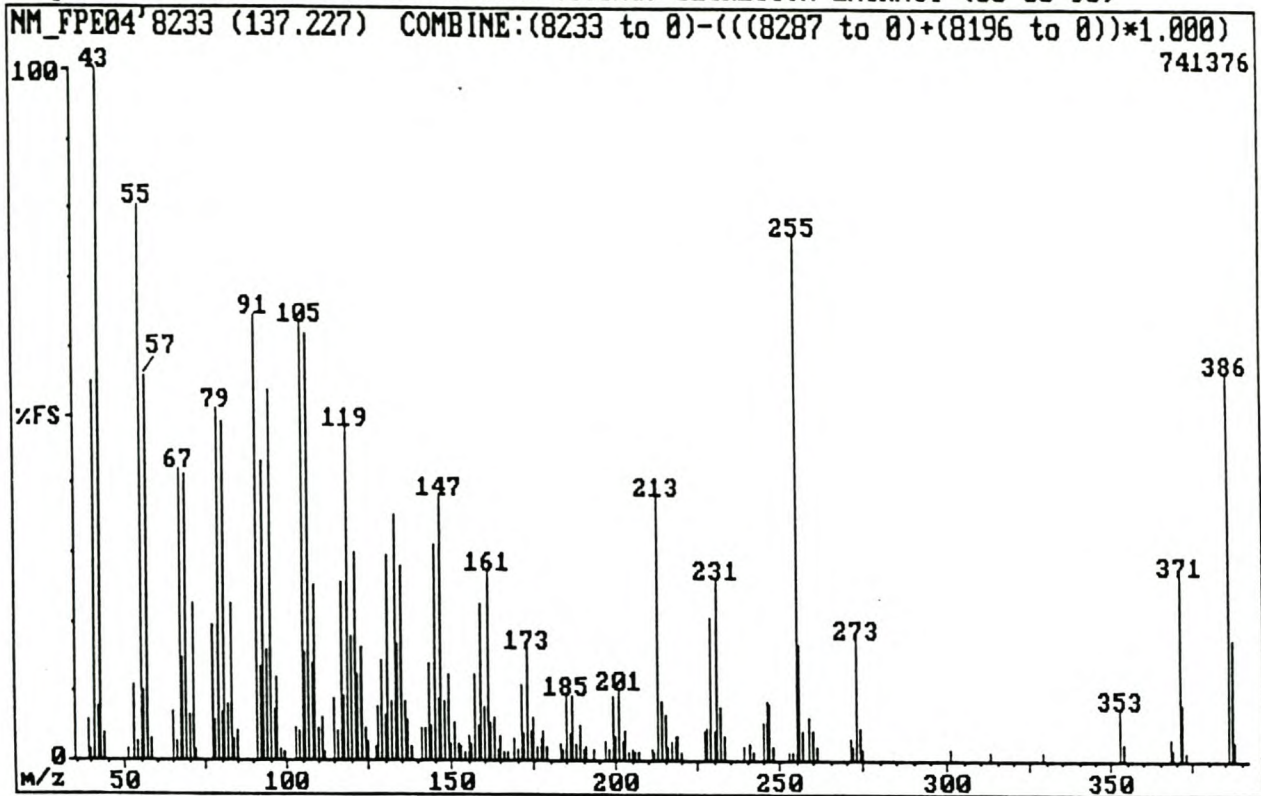
Figuur 2.49: EI-massaspektrum van komponent 8074 [Cholesterol].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



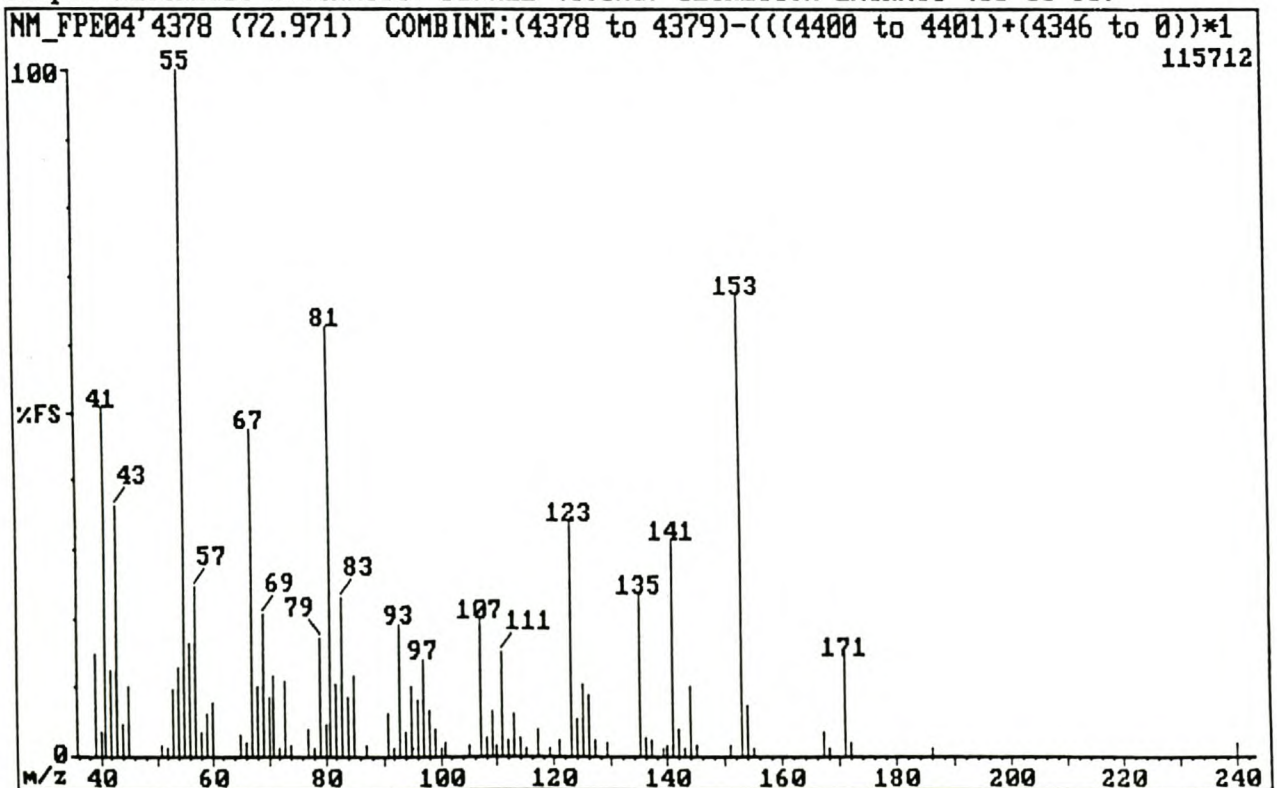
Figuur 2.50: EI-massaspektrum van komponent 8170 [Desmosterol].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



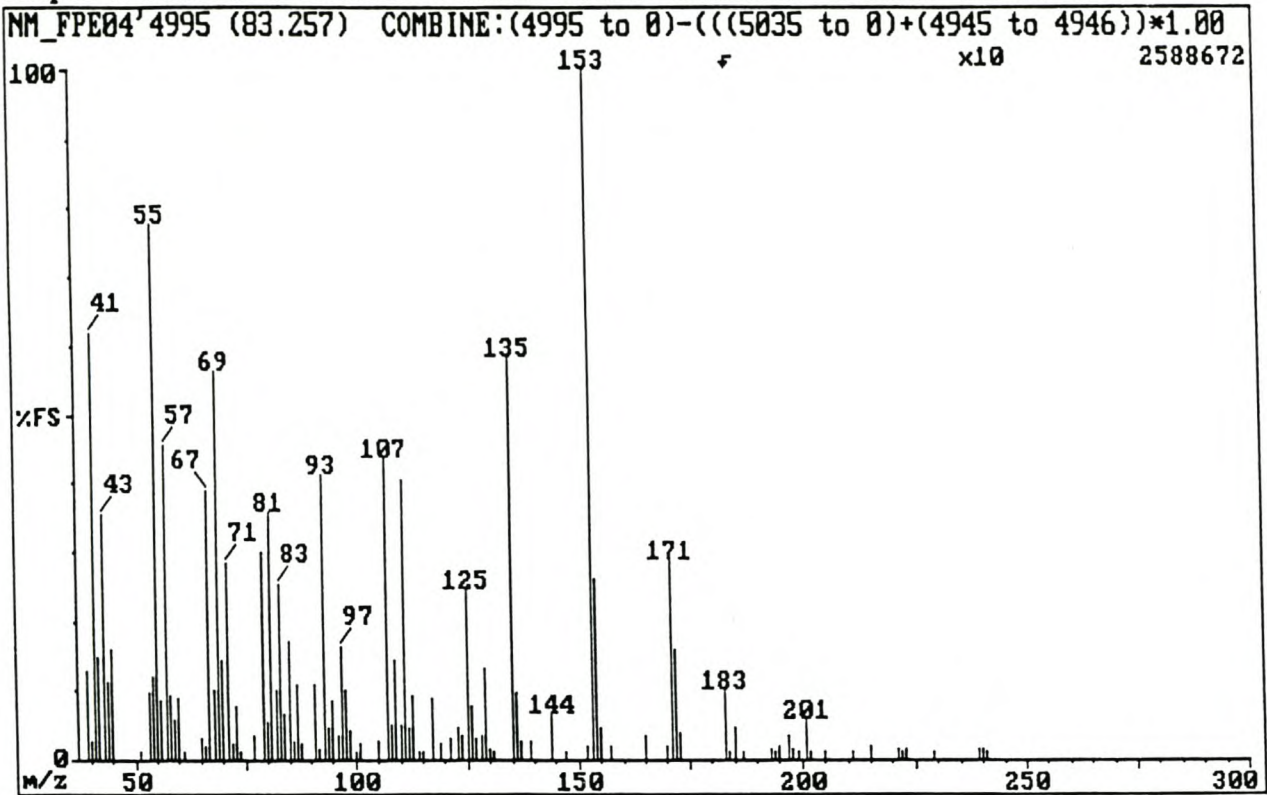
Figuur 2.51: El-massaspektrum van komponent 8234 [Ongeïdentifiseerde steroïedverbinding].

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



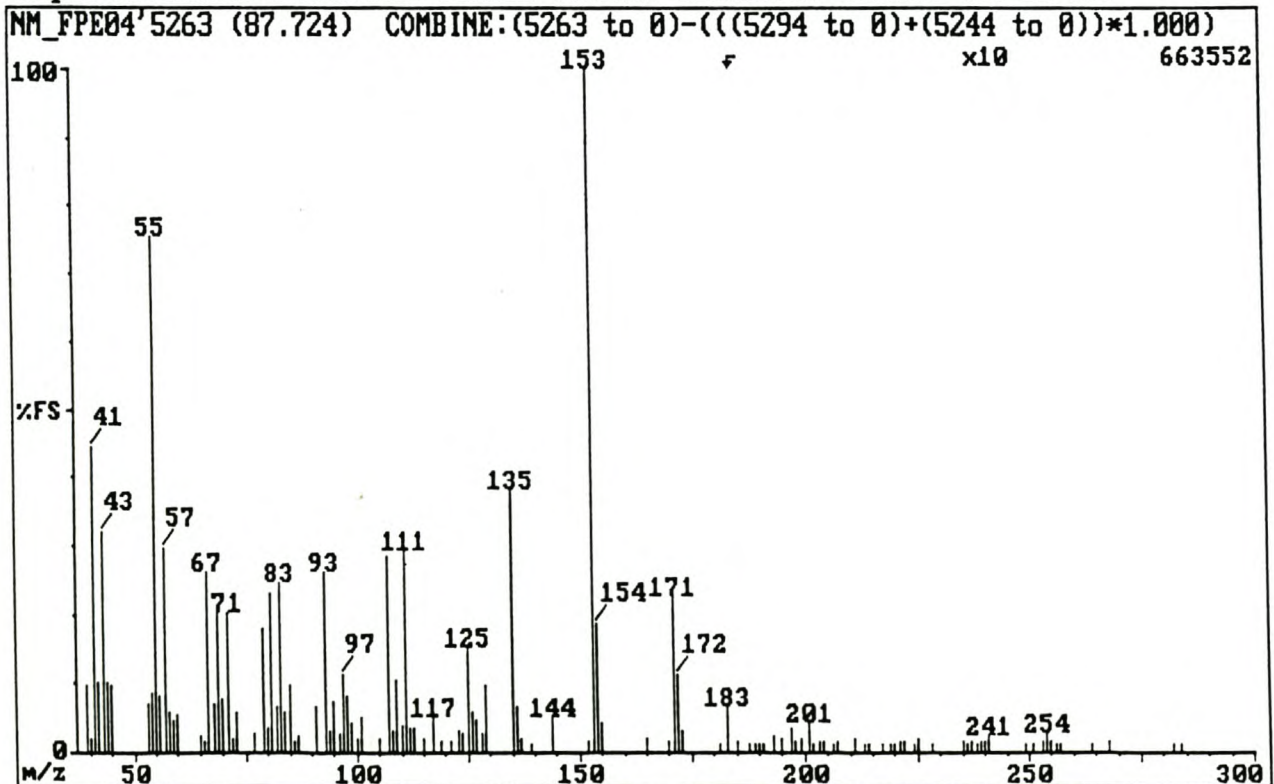
Figuur 2.52: El-massaspektrum van komponent 4378.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



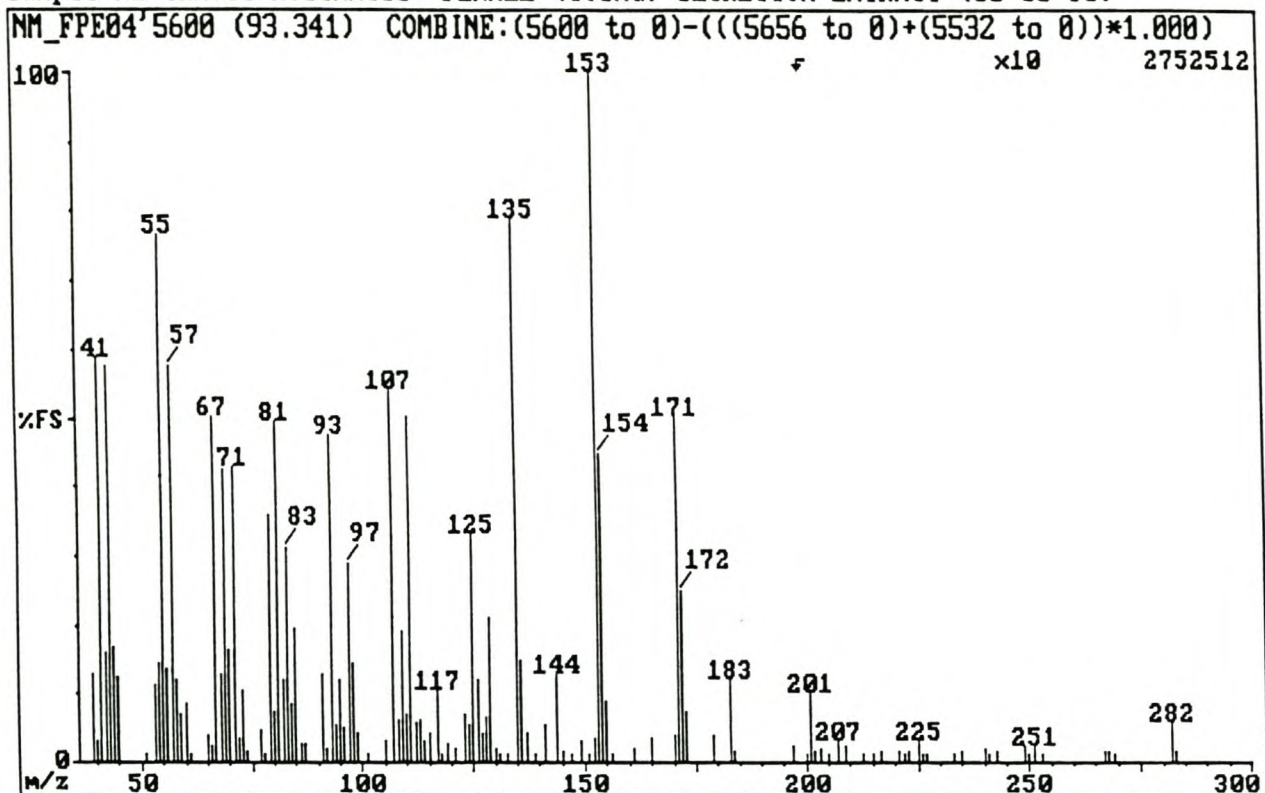
Figuur 2.53: EI-massaspektrum van komponent 5009.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



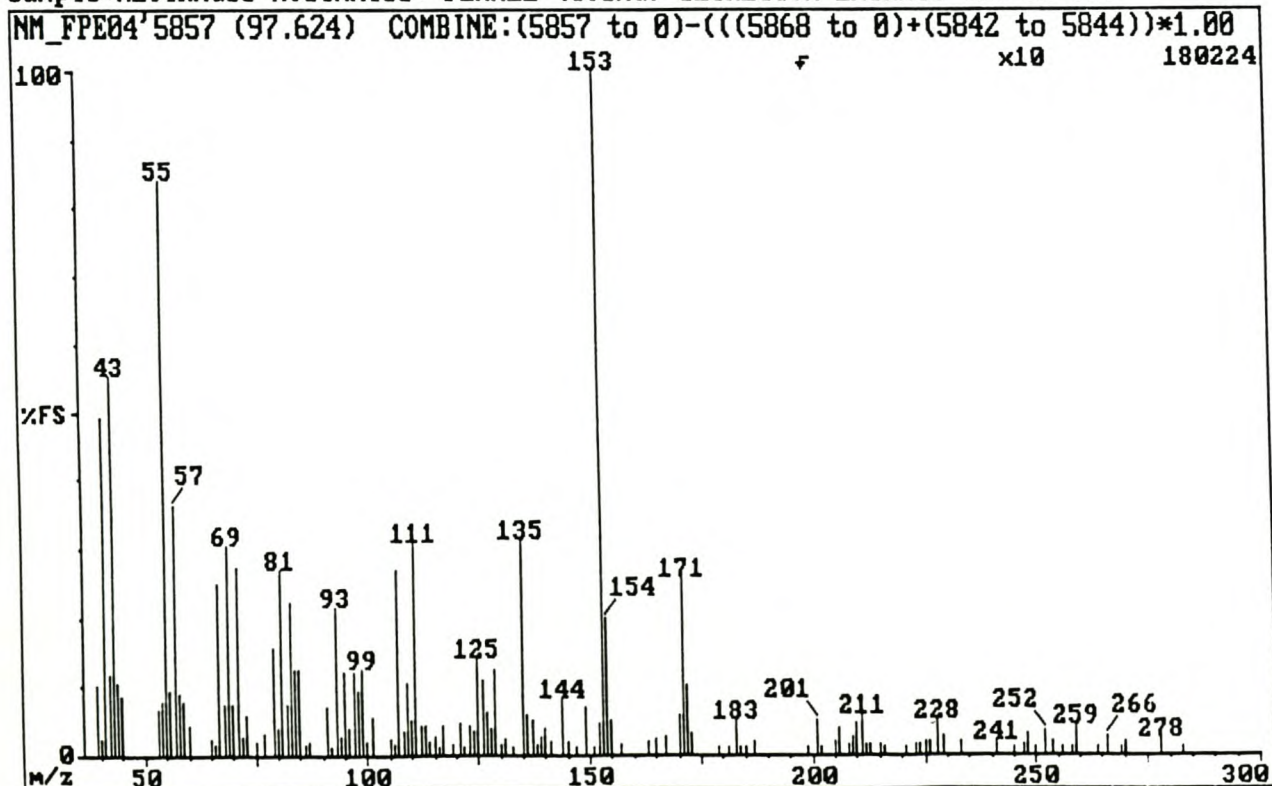
Figuur 2.54: EI-massaspektrum van komponent 5263.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



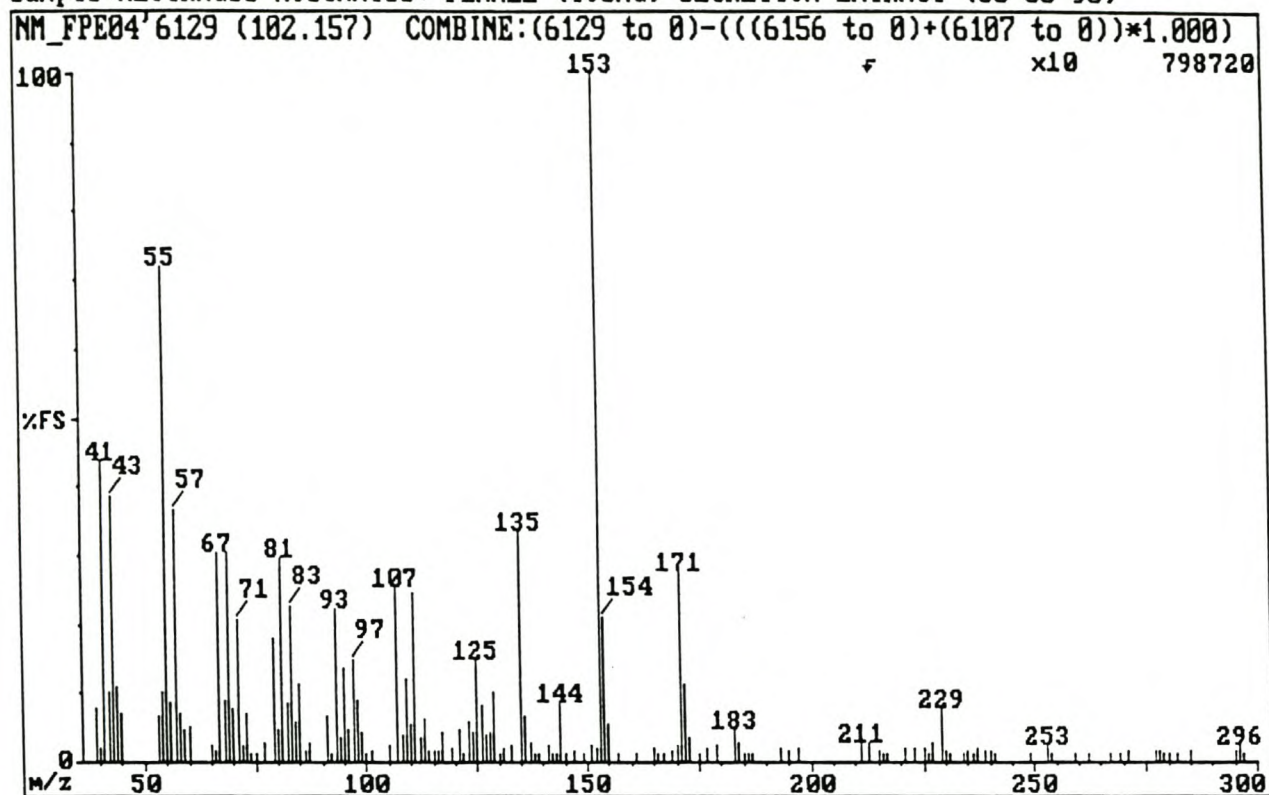
Figuur 2.55: EI-massaspektrum van komponent 5642.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



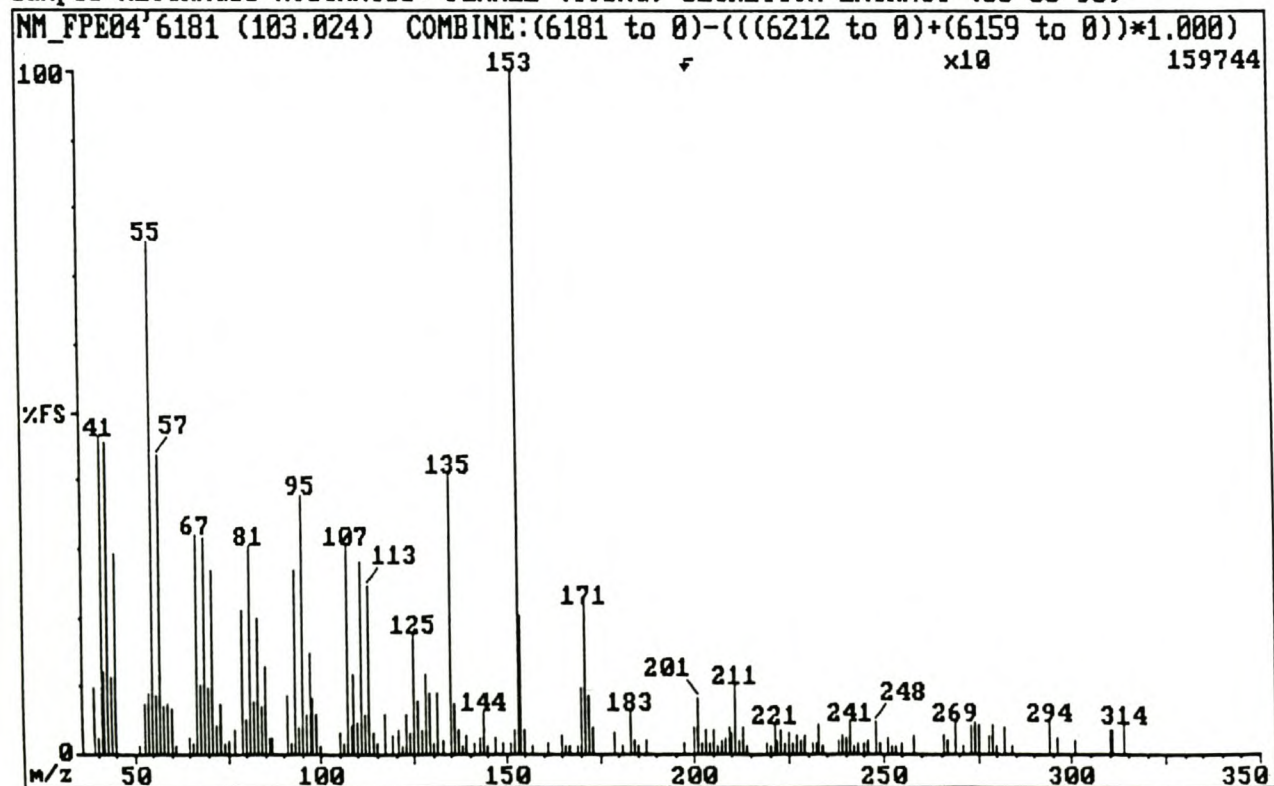
Figuur 2.56: EI-massaspektrum van komponent 5857.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



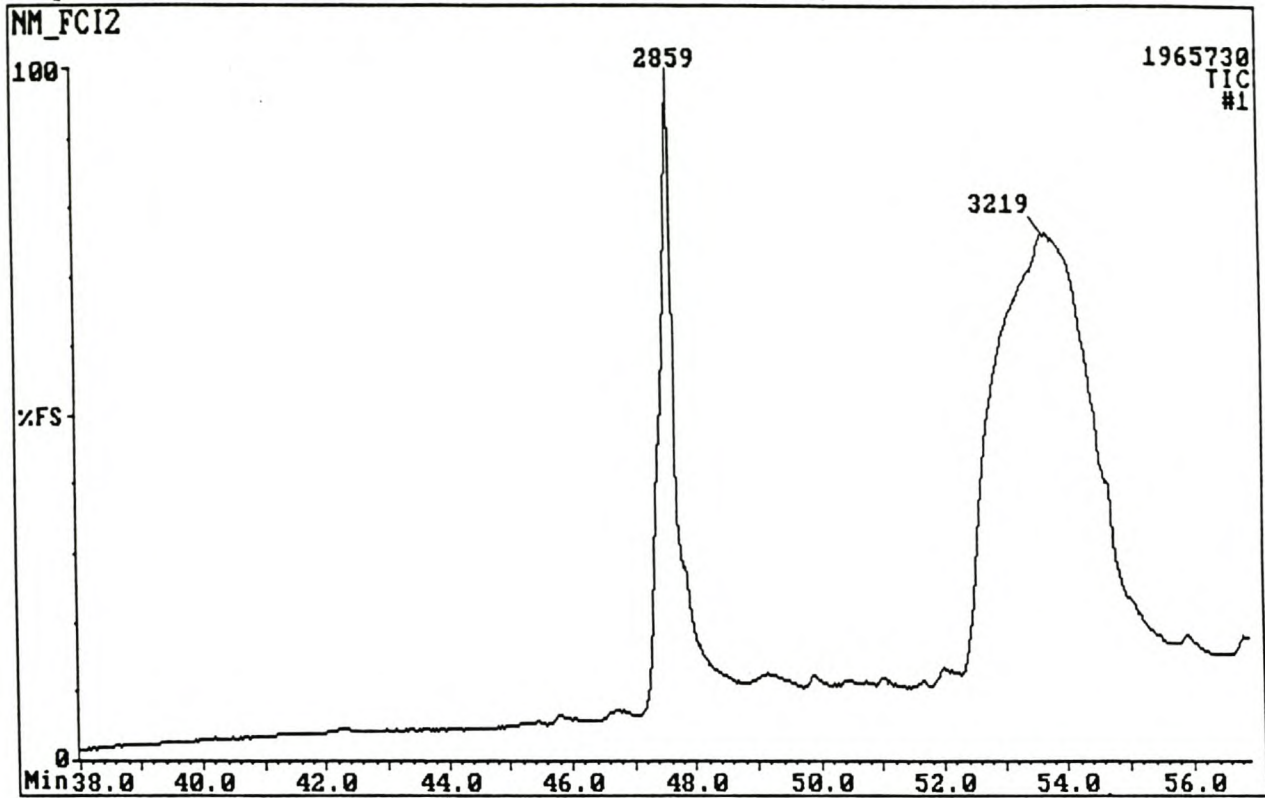
Figuur 2.57: EI-massaspektrum van komponent 6129.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE (YOUNG) SECRETION EXTRACT (03-03-98)



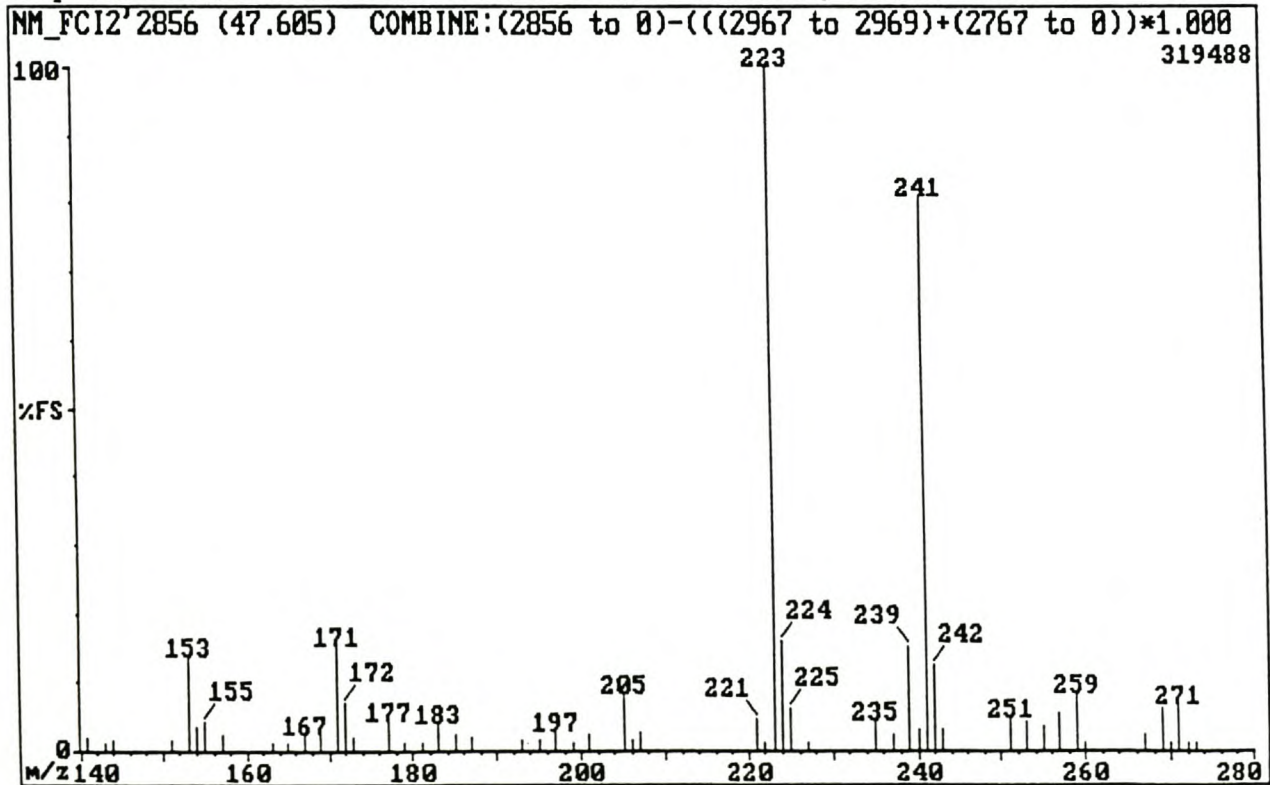
Figuur 2.58: EI-massaspektrum van komponent 6181.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: CI(CH₄) OF ACID FRACTION, FEMALE SECRETION



Figuur 2.59: TIC van die preorbitale afseiding van die suni-ooi met CH₄ as ioniseringsgas en 'n temperatuurprogram van 4°C/min van 40° tot 280°C.

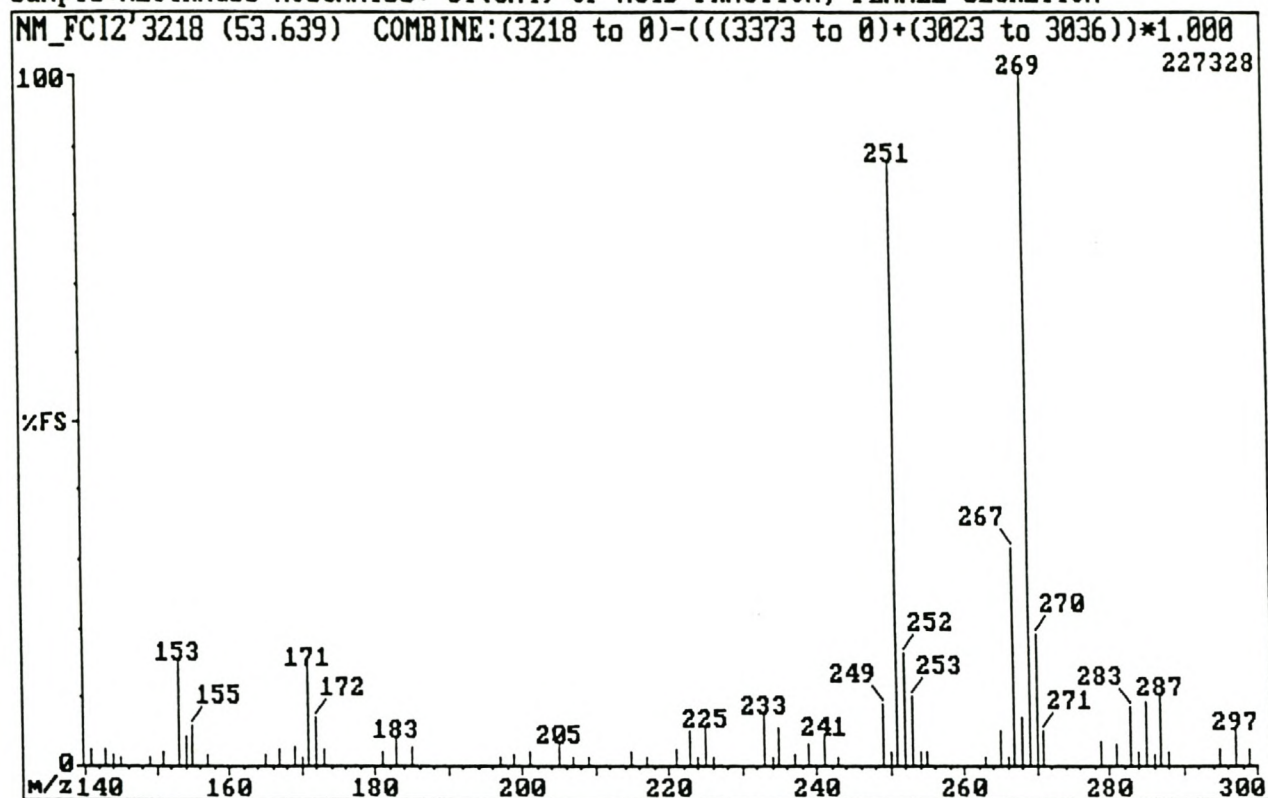
Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: CI(CH₄) OF ACID FRACTION, FEMALE SECRETION



Figuur 2.60: CI-massaspektrum van komponent 5009^a soos verkry uit Figuur 2.59, met CH₄ as reaktantgas.

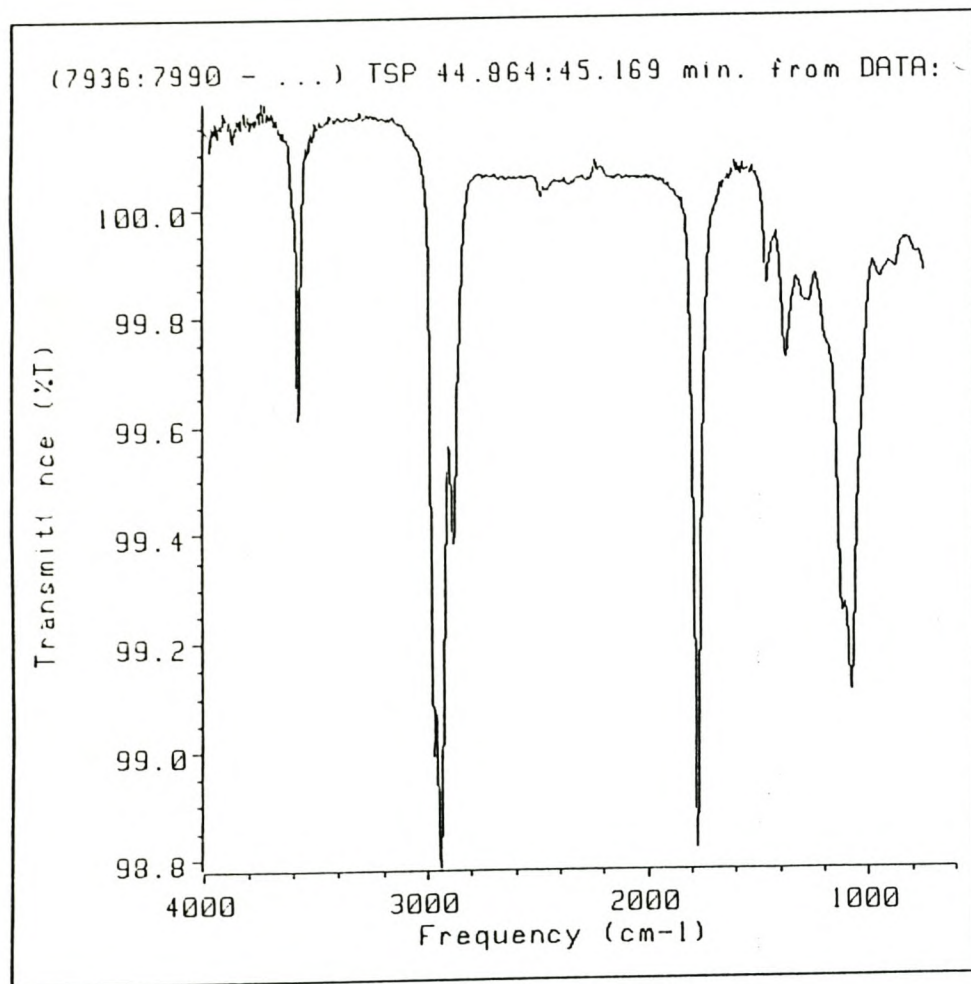
^aNommer van die betrokke komponent in die elektron-impak TIC.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: CI(CH₄) OF ACID FRACTION, FEMALE SECRETION

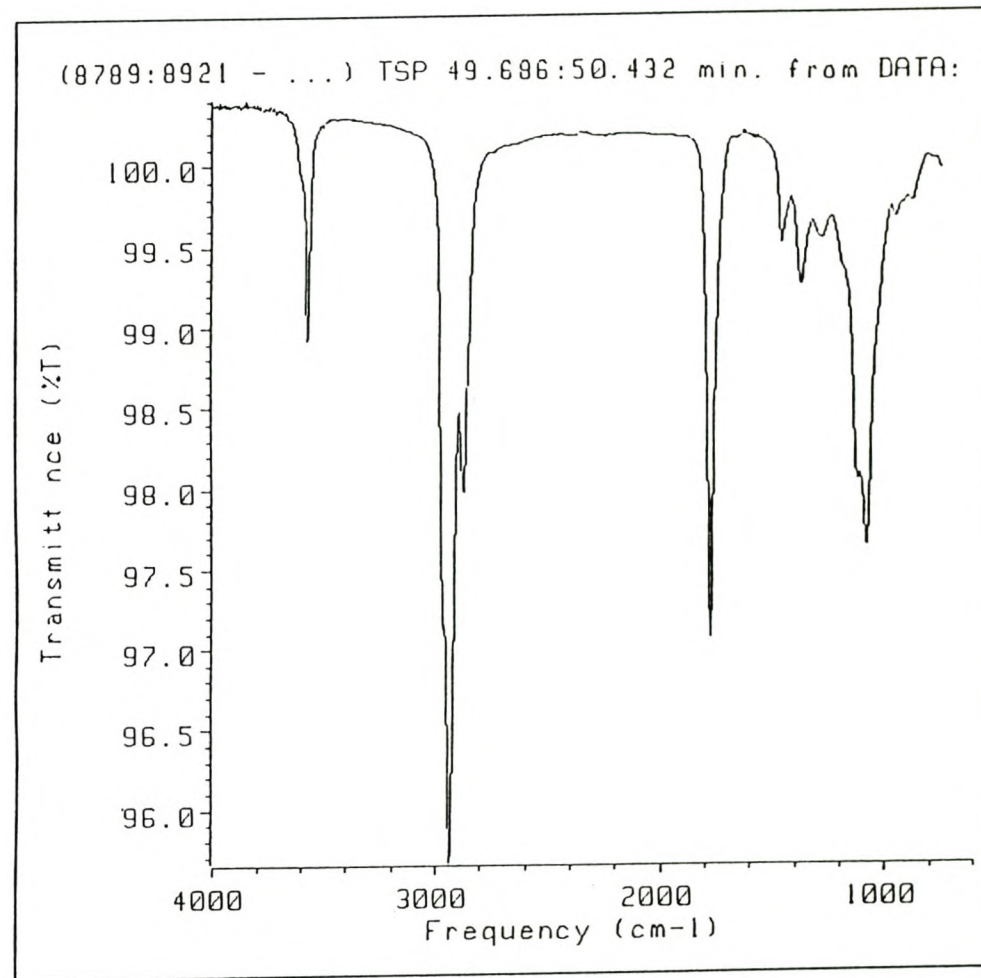


Figuur 2.61: CI-massaspektrum van komponent 5642^b soos verkry uit Figuur 2.59, met CH₄ as reaktantgas.

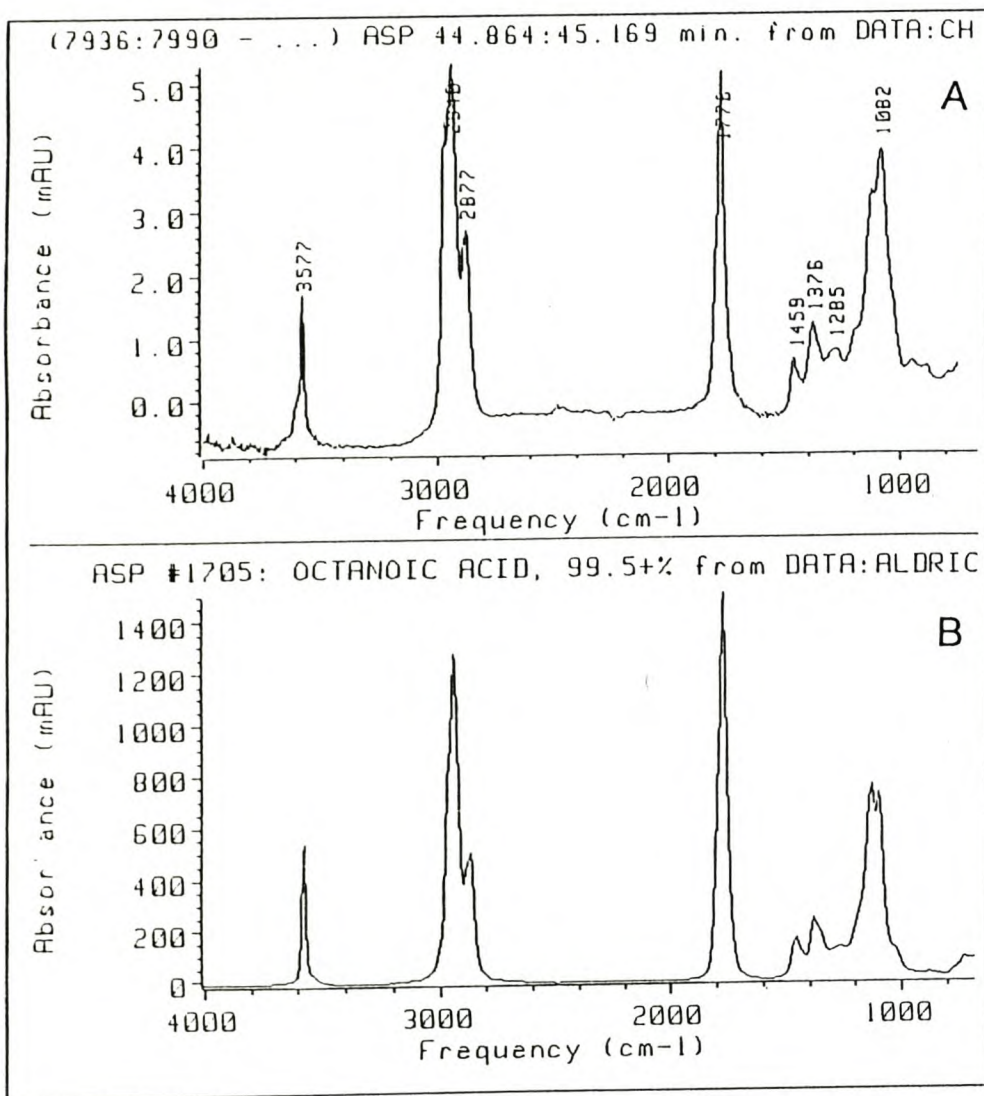
^b Nommer van die betrokke komponent in die elektron-impak TIC.



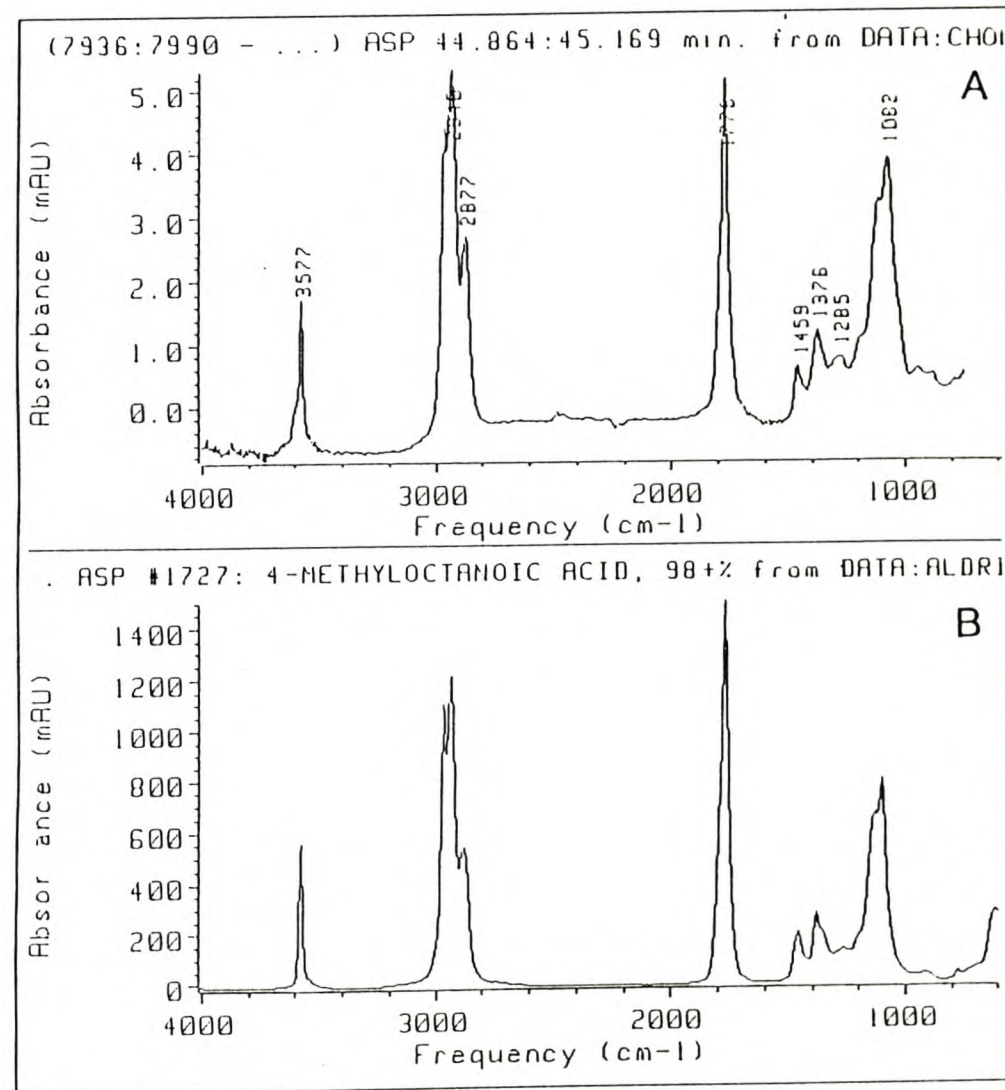
Figuur 2.62: IR-spektrum (GC-IR) van komponent 5009.



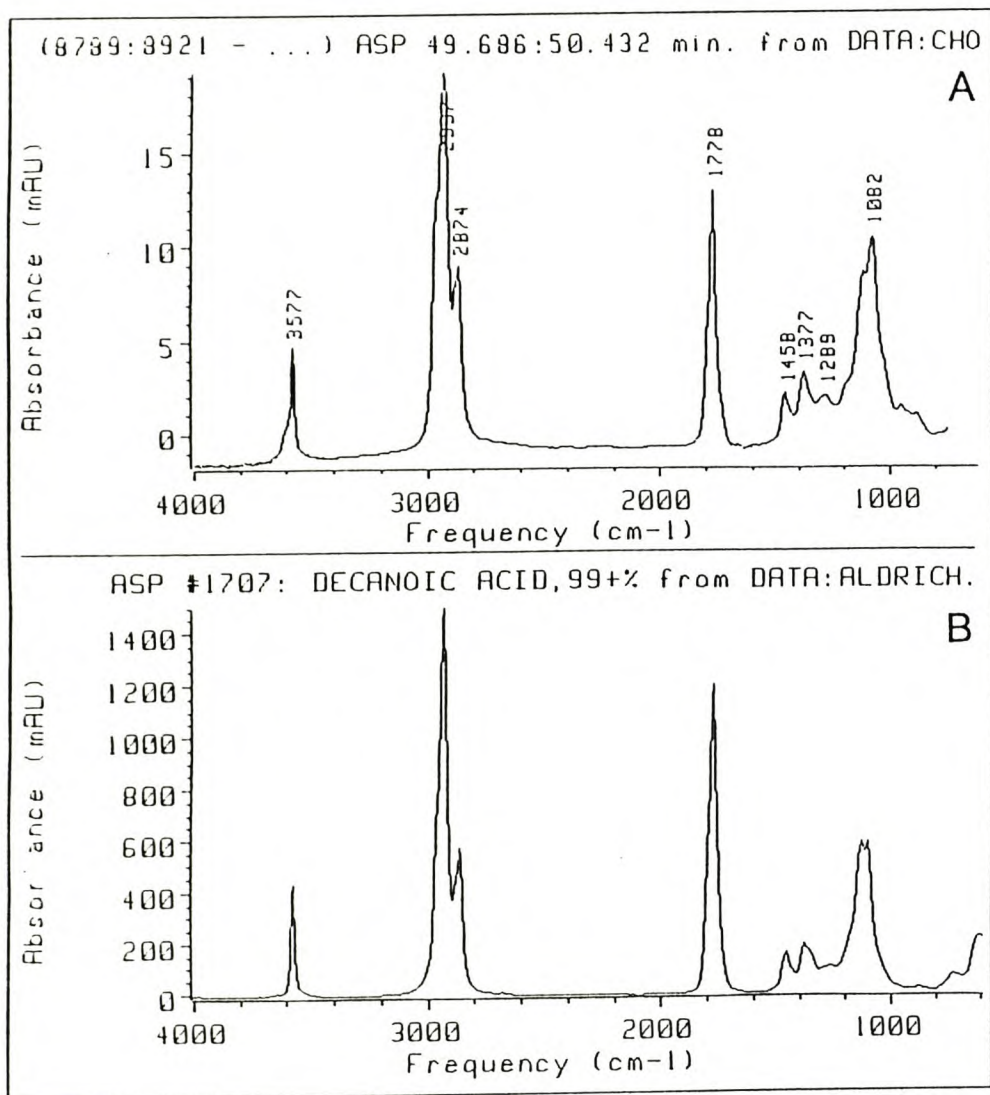
Figuur 2.63: IR-spektrum (GC-IR) van komponent 5642.



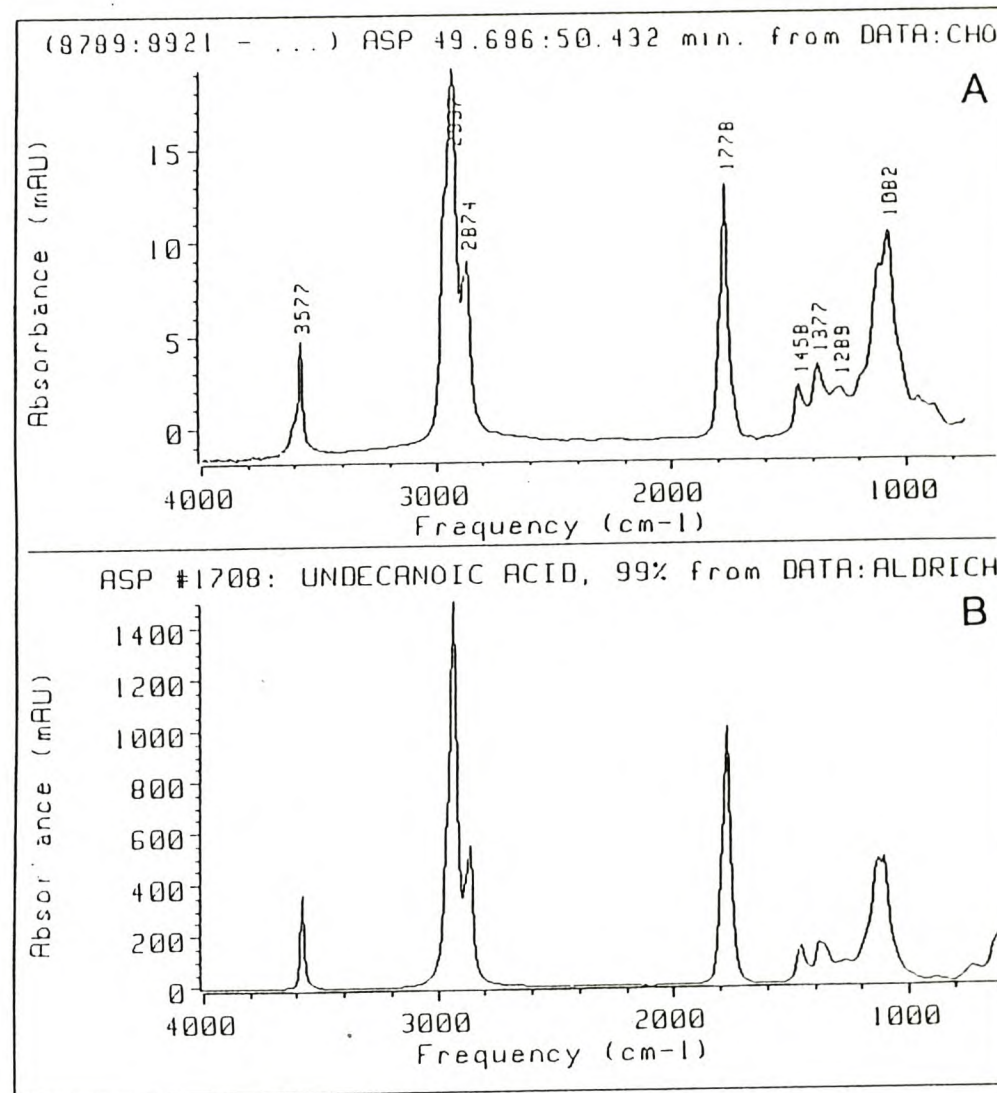
Figuur 2.64: IR-spektra van Oktanoësuur (A) en komponent 5009 (B).



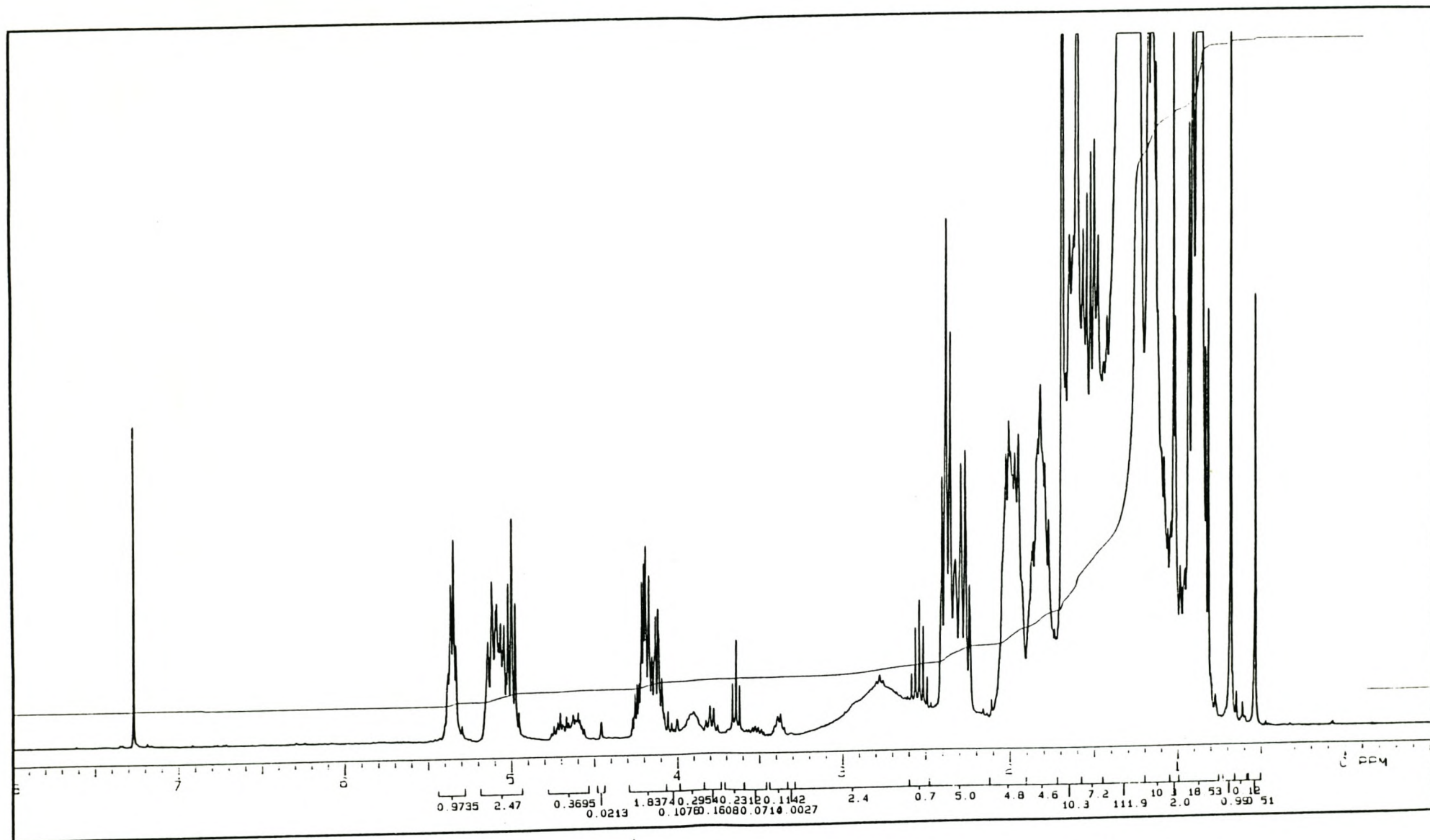
Figuur 2.65: IR-spektra van 4-Metieloktanoësuur (A) en komponent 5009 (B).



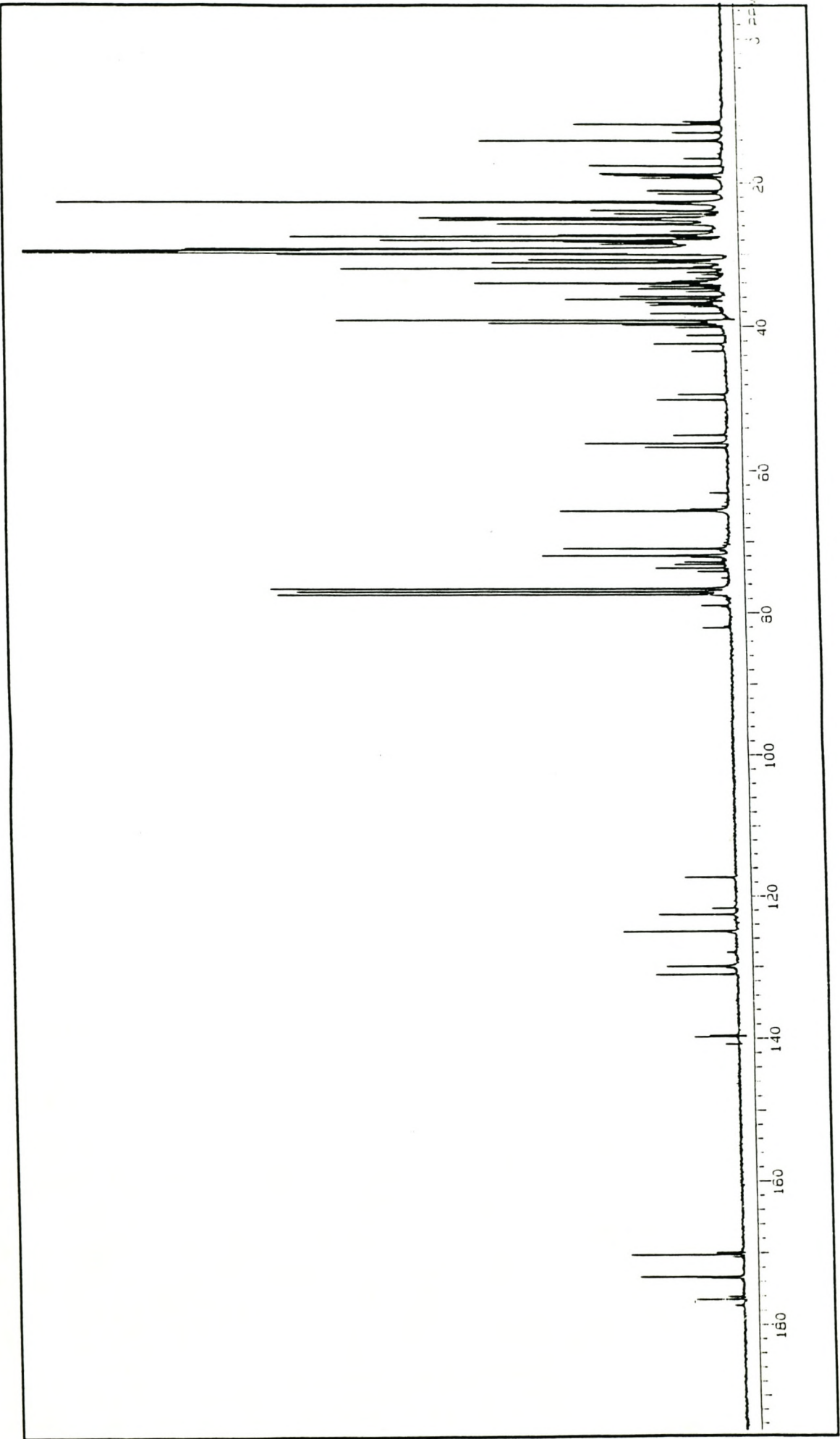
Figuur 2.66: IR-spektra van Dekanoësuur (A) en komponent 5642 (B).



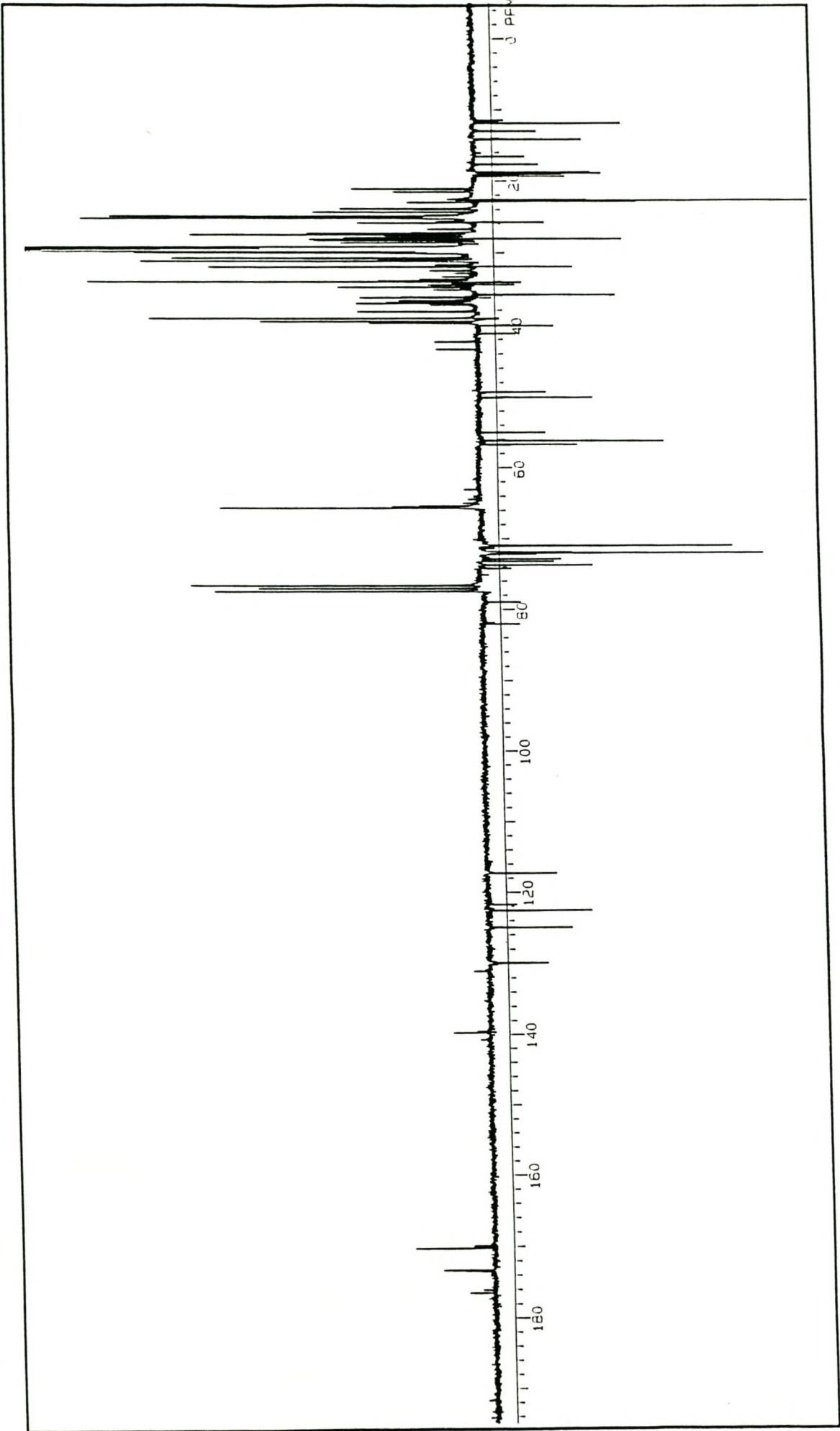
Figuur 2.67: IR-spektra van Undekanoësuur (A) en komponent 5642 (B).



Figuur 2.68: ^1H -KMR spektrum van die preorbitale afskeiding van die suni-ooi.

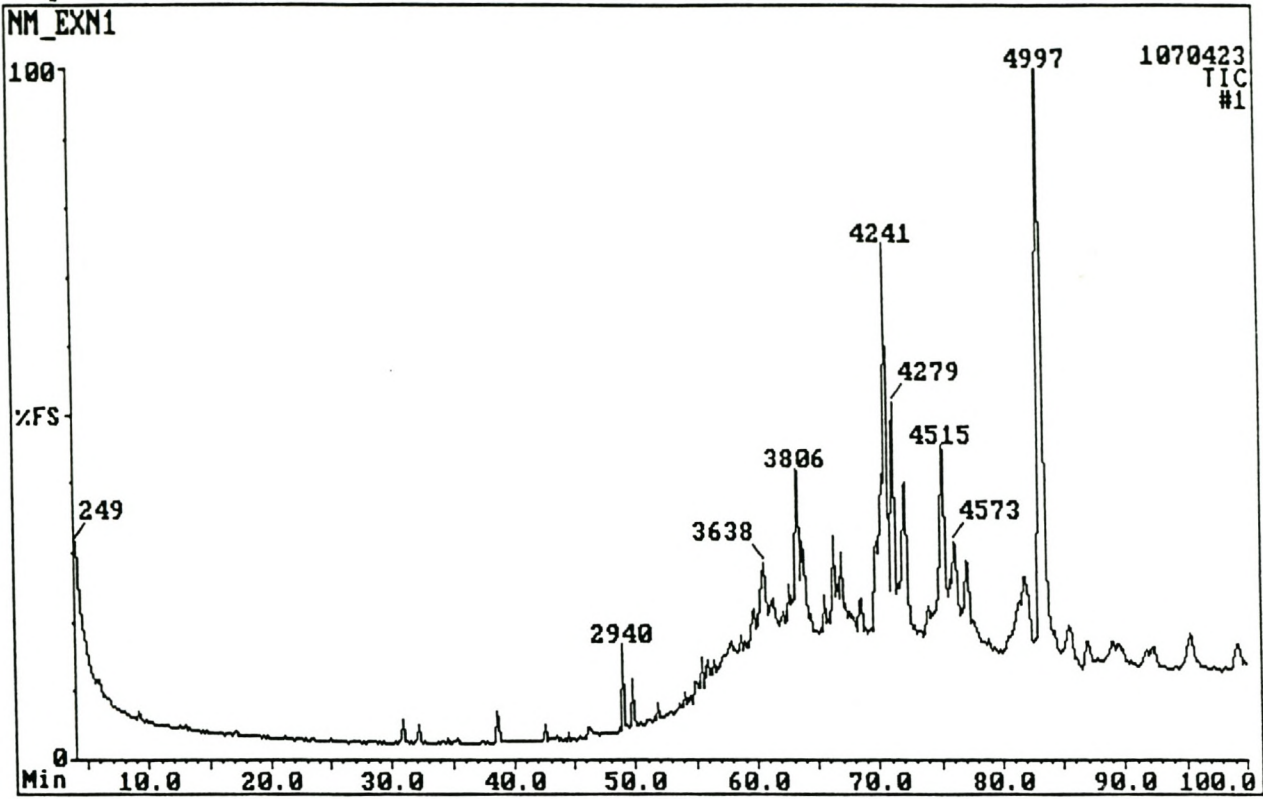


Figuur 2.69: ^{13}C -KMR spektrum van die preorbitale afskeiding van die suni-001.

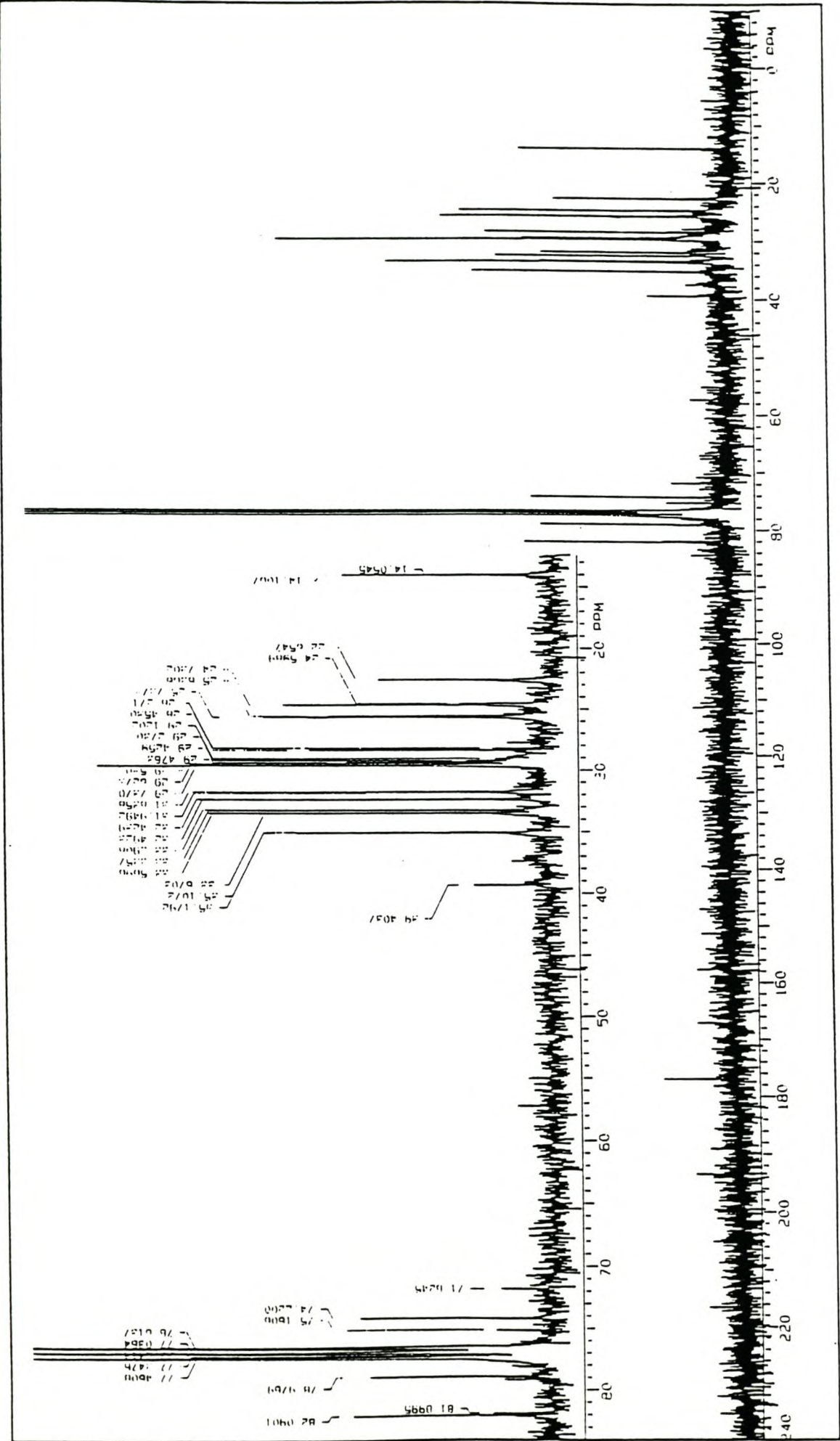


Figuur 2.70: APT-spektrum van die preorbitale afseiding van die suni-ooi.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE SECR., TEST EXTRACT., NEUTRAL FRACTION 1

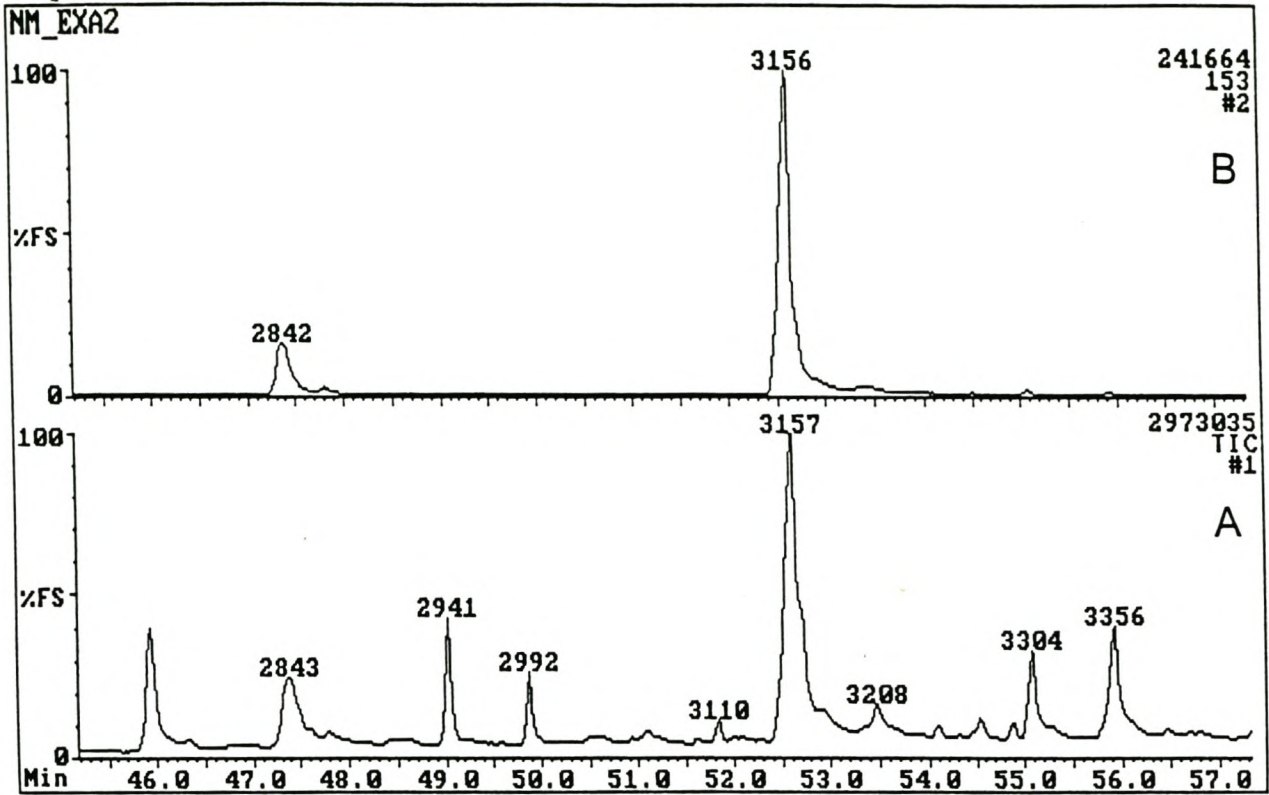


Figuur 2.71: TIC van die chloroformlaag na ekstrakie van sure as soute.



Figuur 2.72: ^{13}C -KMR spektrum van suurfraksie A.

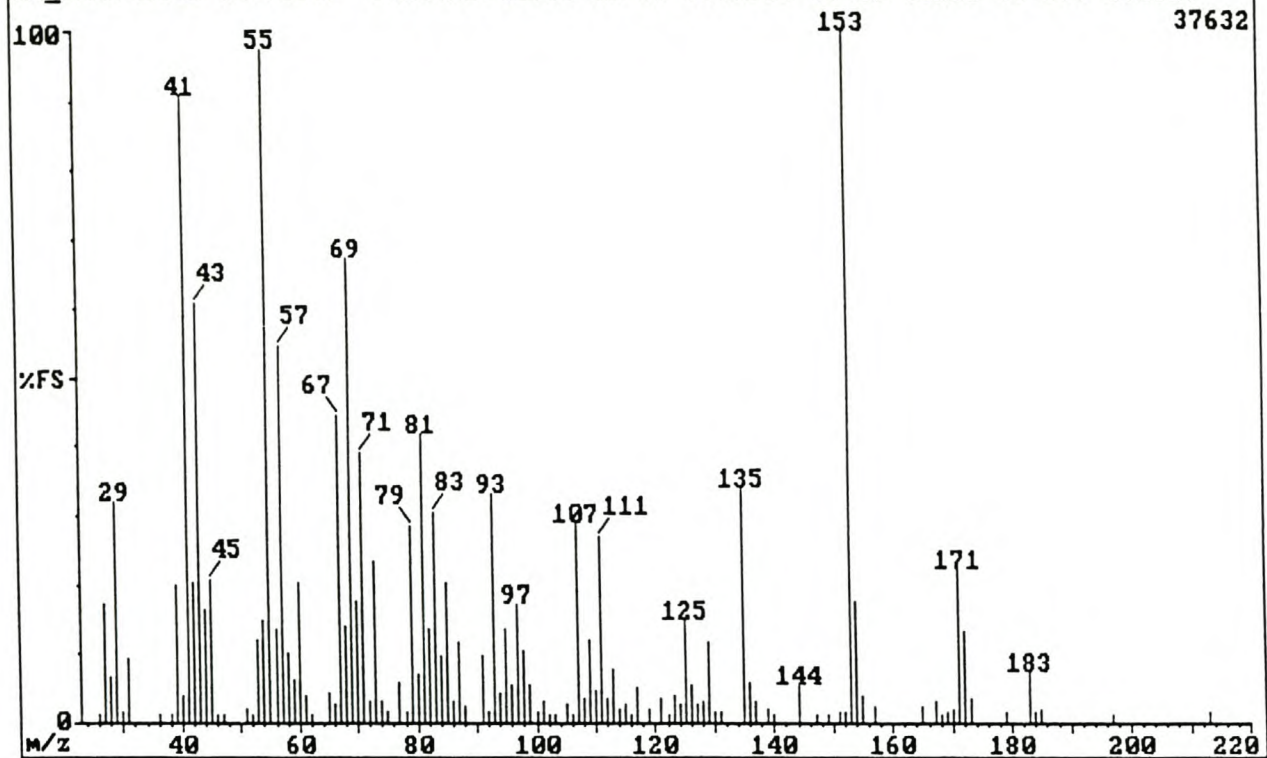
Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE SECR., ACID FRACTION



Figuur 2.73: Die TIC (A) en enkel-ioonstroomchromatogram vir die ioon m/z 153 (B), waaruit gesien kan word dat die komponente met m/z 153 wel in Suurfraksie A voorkom. (GC-MS analise met 'n temperatuurprogram van 4°C/min van 40° tot 280°C).

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE SECR., ACID FRACTION

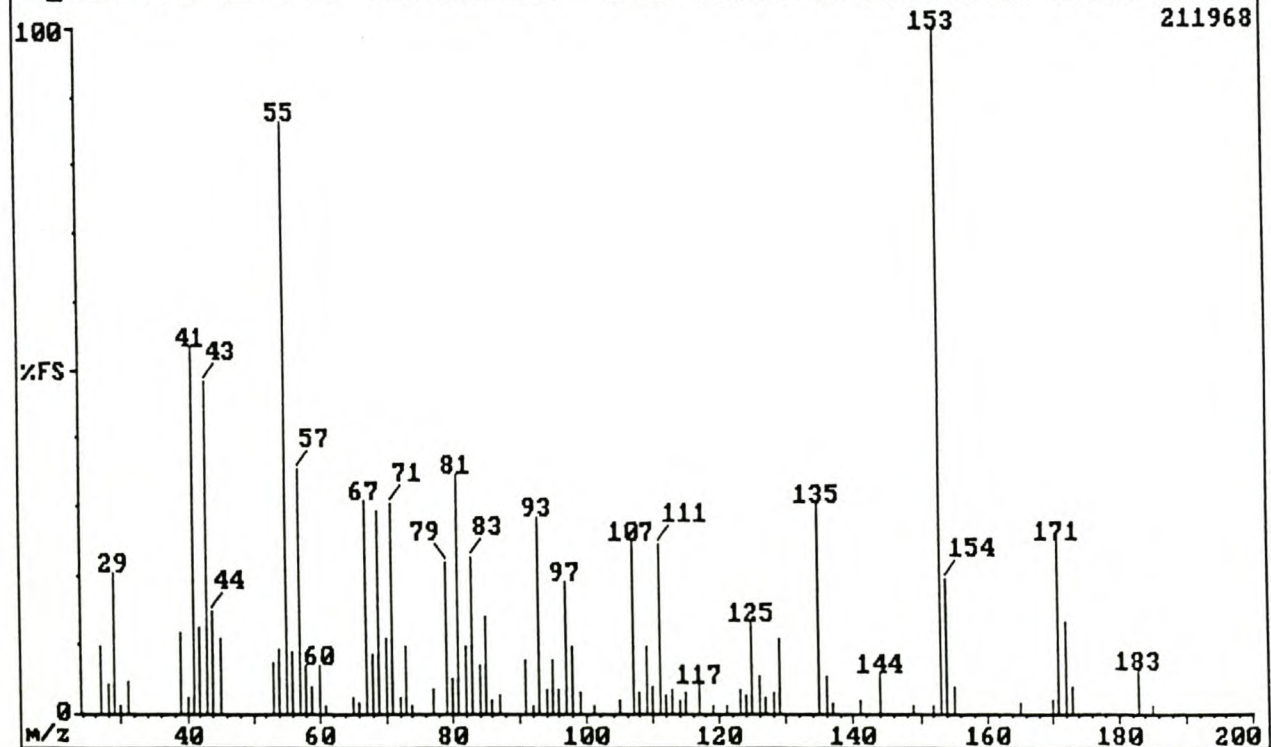
NM_EXA2' 2841 (47.354) COMBINE: (2841 to 0) - (((2860 to 0) + (2825 to 0)) * 1.000)



Figuur 2.74: El-massaspektrum van komponent 5009^c (kyk Figuur 2.73).

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE SECR., ACID FRACTION

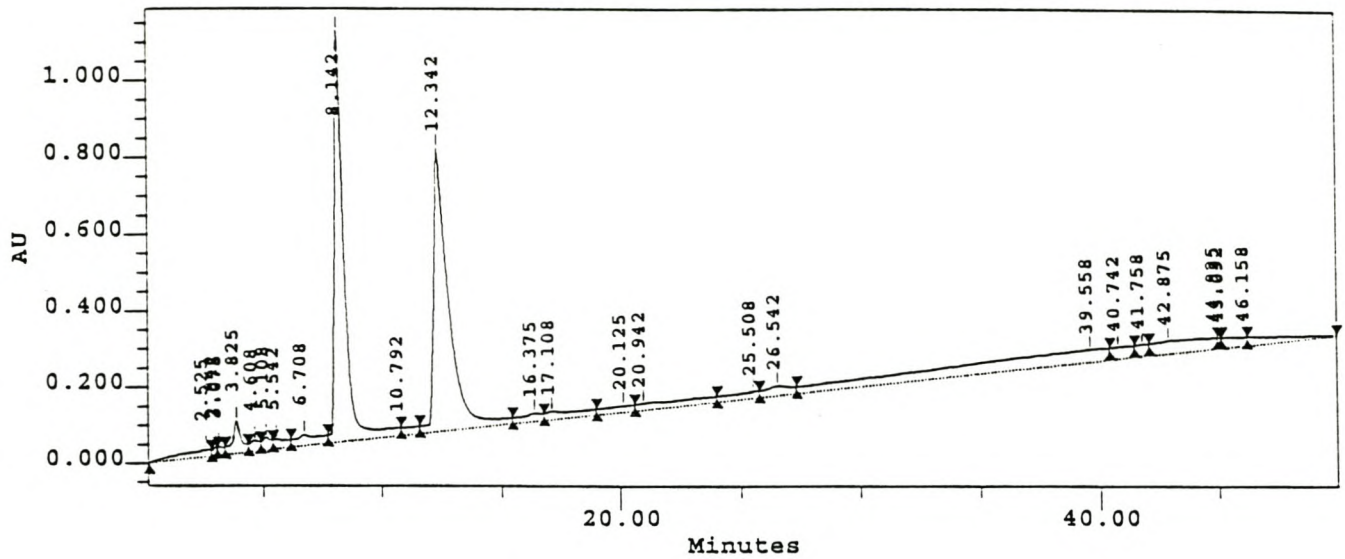
NM_EXA2' 3155 (52.587) COMBINE: (3155 to 0) - (((3173 to 3174) + (3138 to 0)) * 1.000)



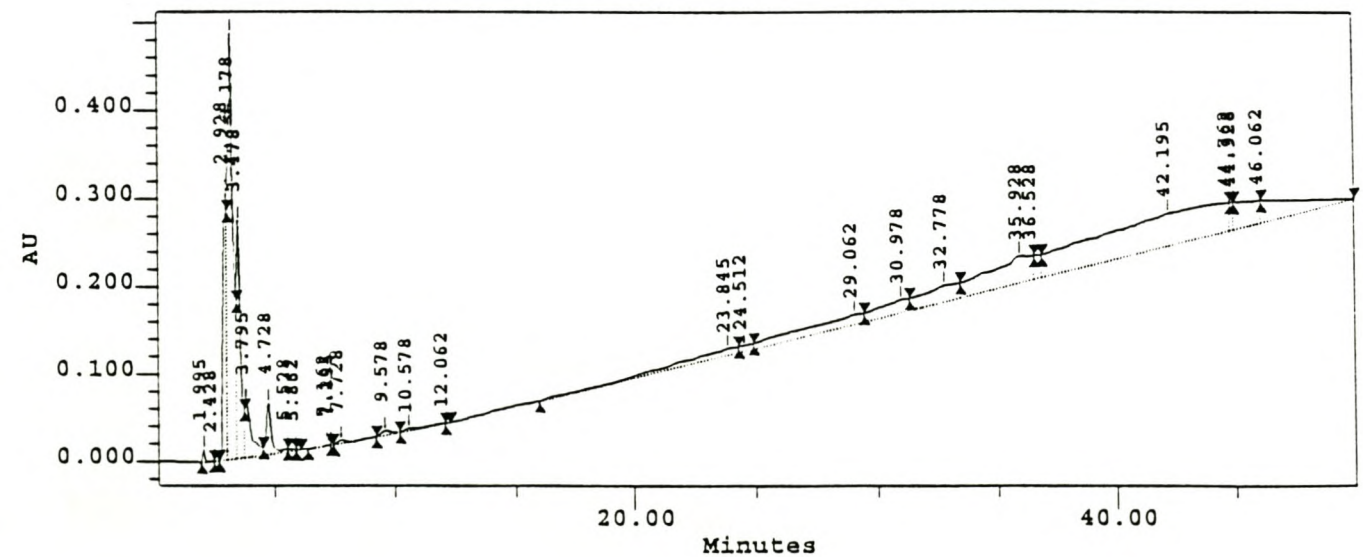
Figuur 2.75: El-massaspektrum van komponent 5642^d (kyk Figuur 2.76).

^c Nommer van die betrokke komponent in die oorspronklike TIC.

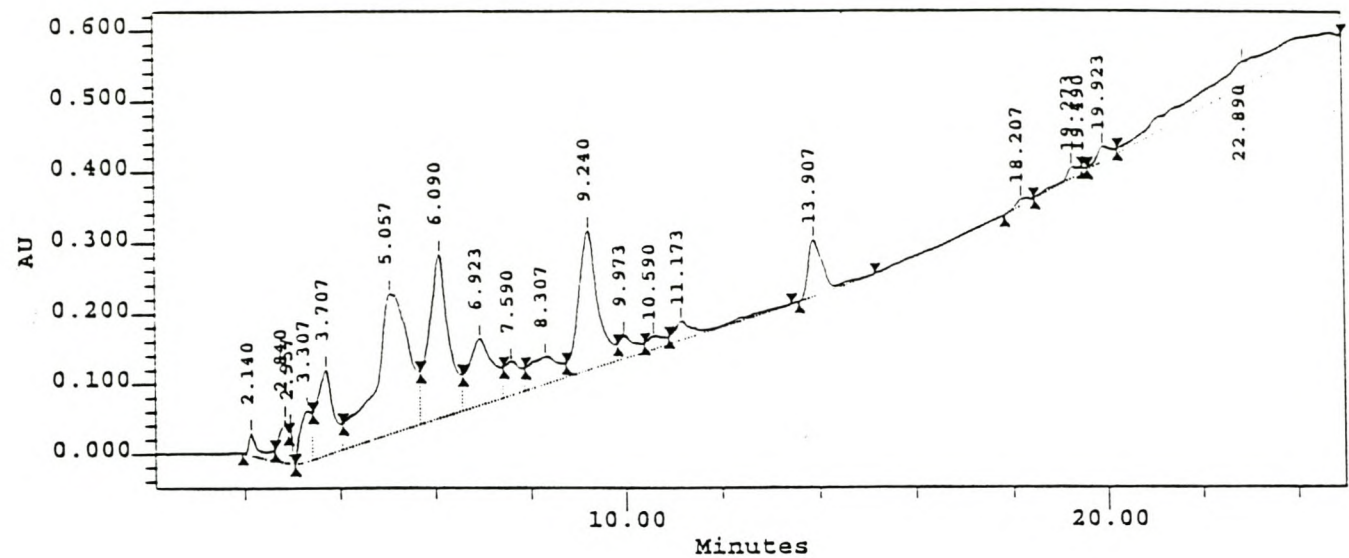
^d Nommer van die betrokke komponent in die oorspronklike TIC.



Figuur 2.76: Die vloeistofchromatogram van palmitien- en oleïensuur om skeidingskondisies te verkry.



Figuur 2.77: Die vloeistofchromatogram van suurfraksie A by kondisies soos verkry met behulp van palmitien- en oleïensuur.



Figuur 2.78: Die vloeistofchromatogram van suurfraksie A met veranderde skeidingskondisies. Dit is duidelik dat dit meer suksesvol was.

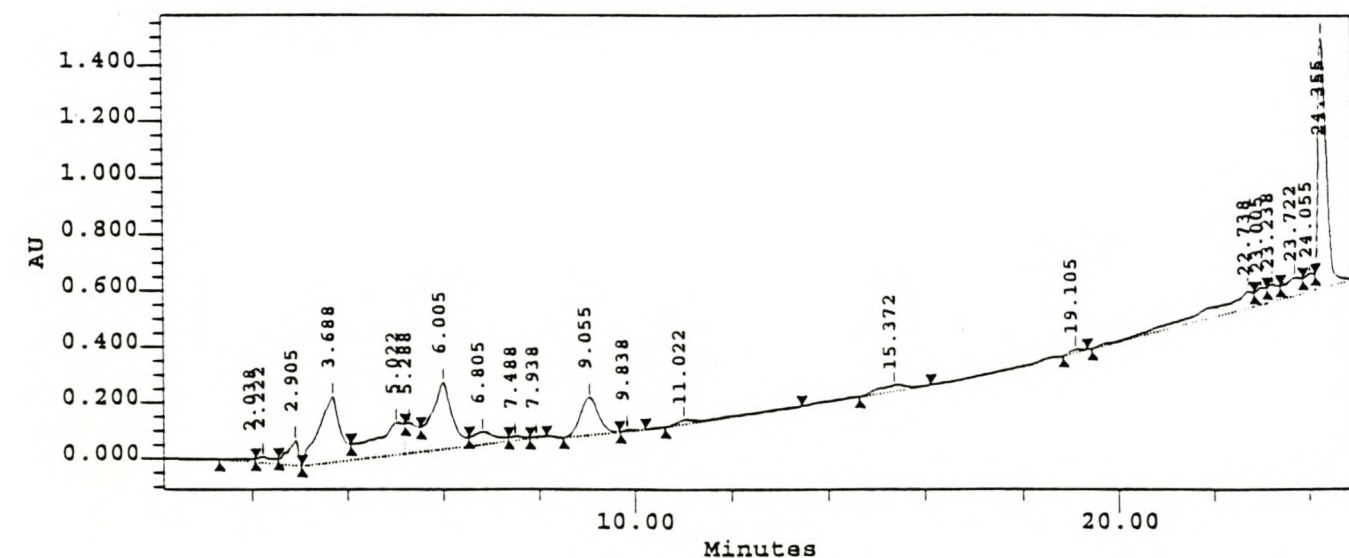
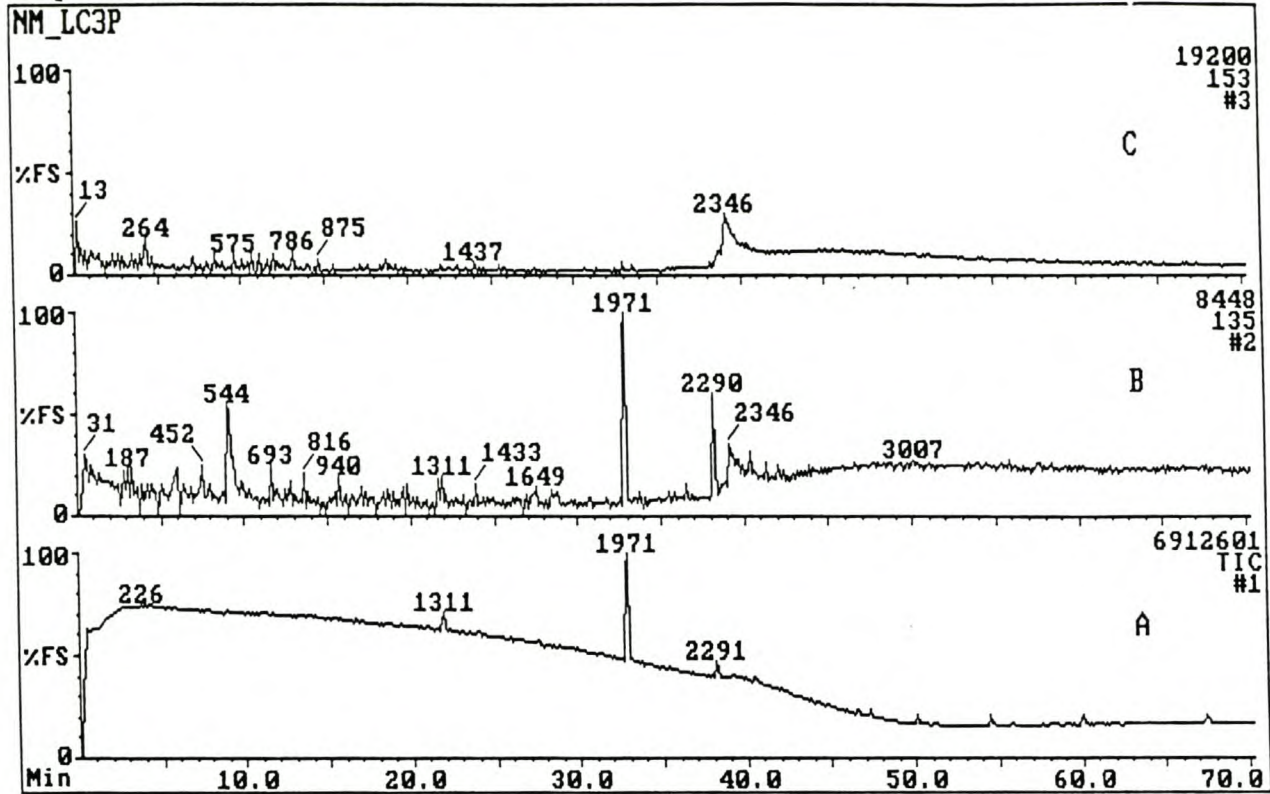


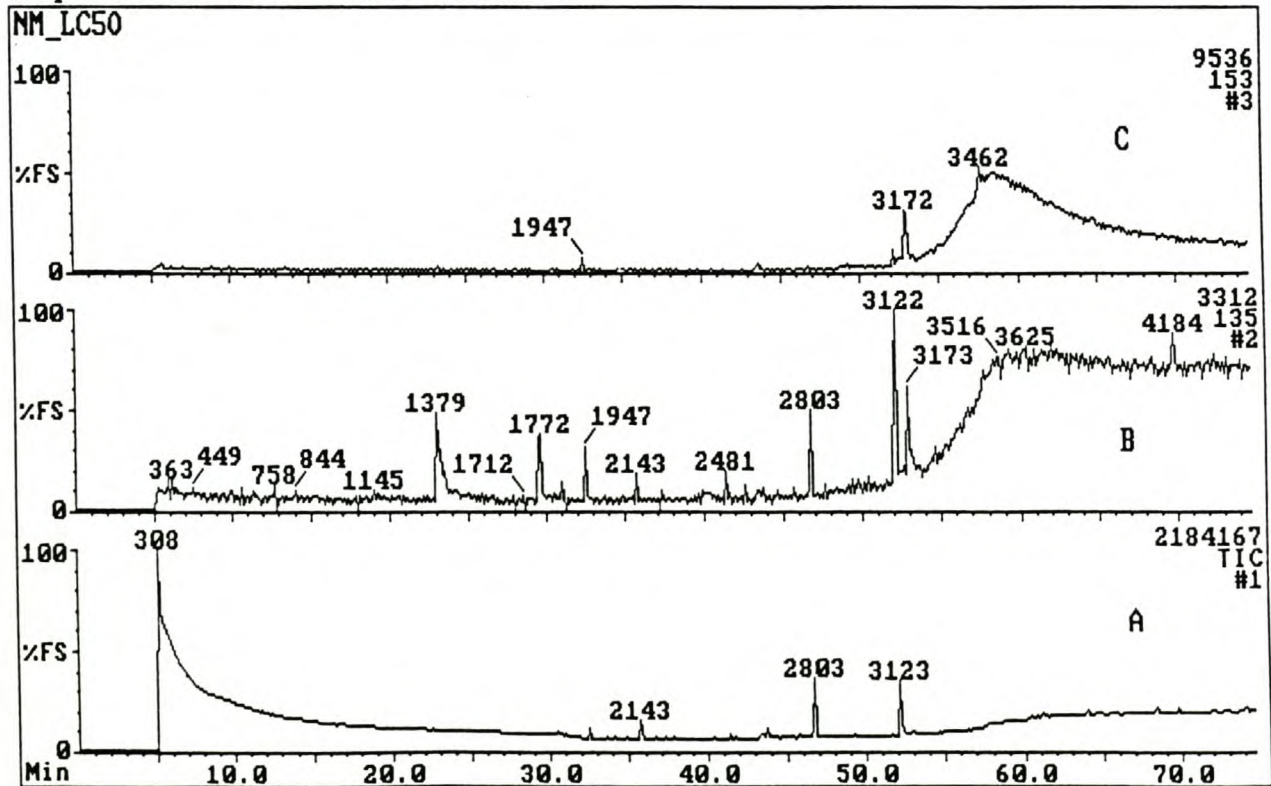
Fig. 2.79: Die vloeistofchromatogram van 'n MeOH-ekstrak van die pre-orbitale afskeiding van die suni-ooi.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: HPLC 3-P



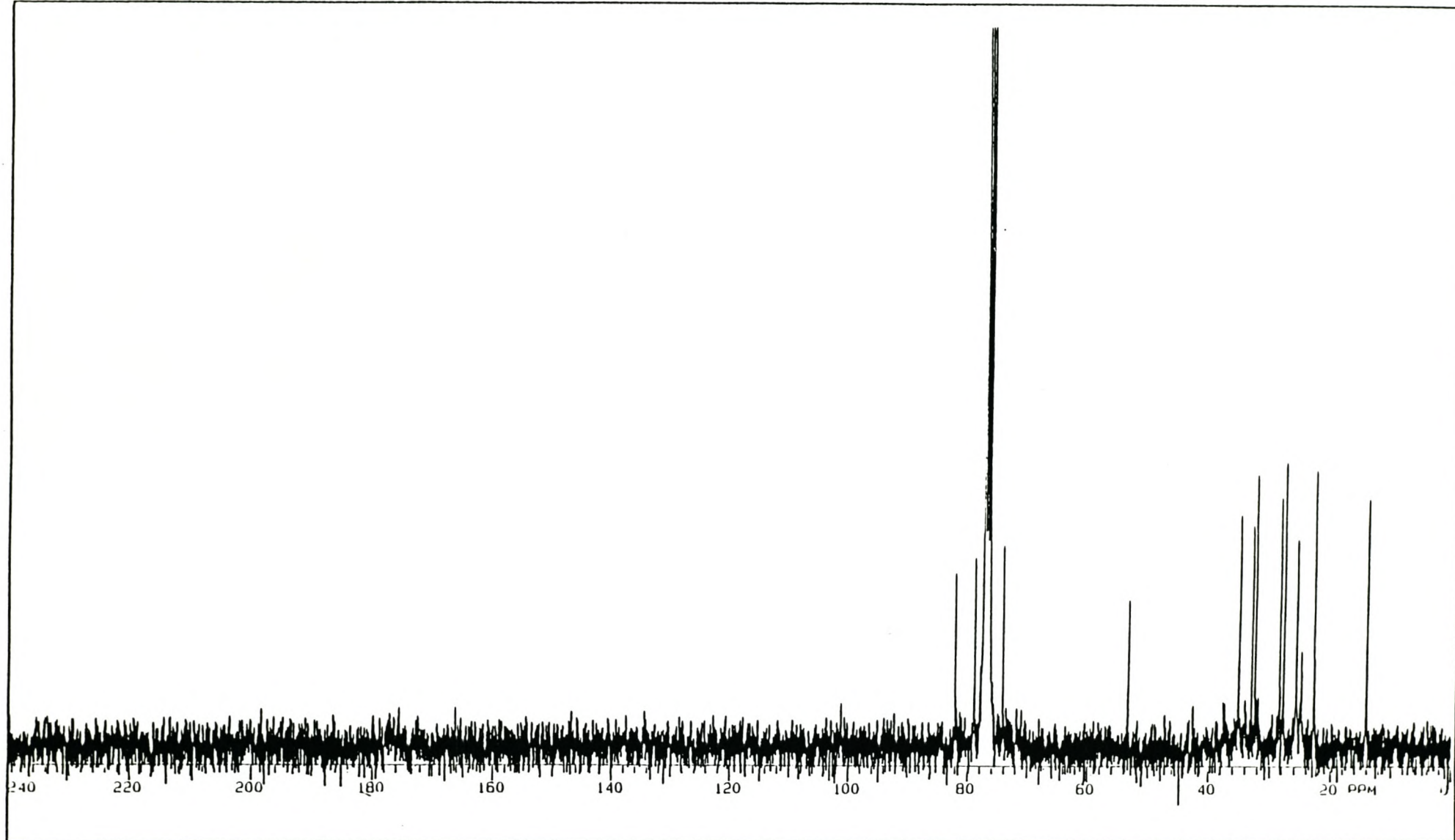
Figuur 2.80: Die TIC (A) en enkelioonstroomchromatogramme vir m/z 135 (B) en m/z 153 (C) van Fraksie 3 soos verkry uit die HPLC-skeiding.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: HPLC 5-0

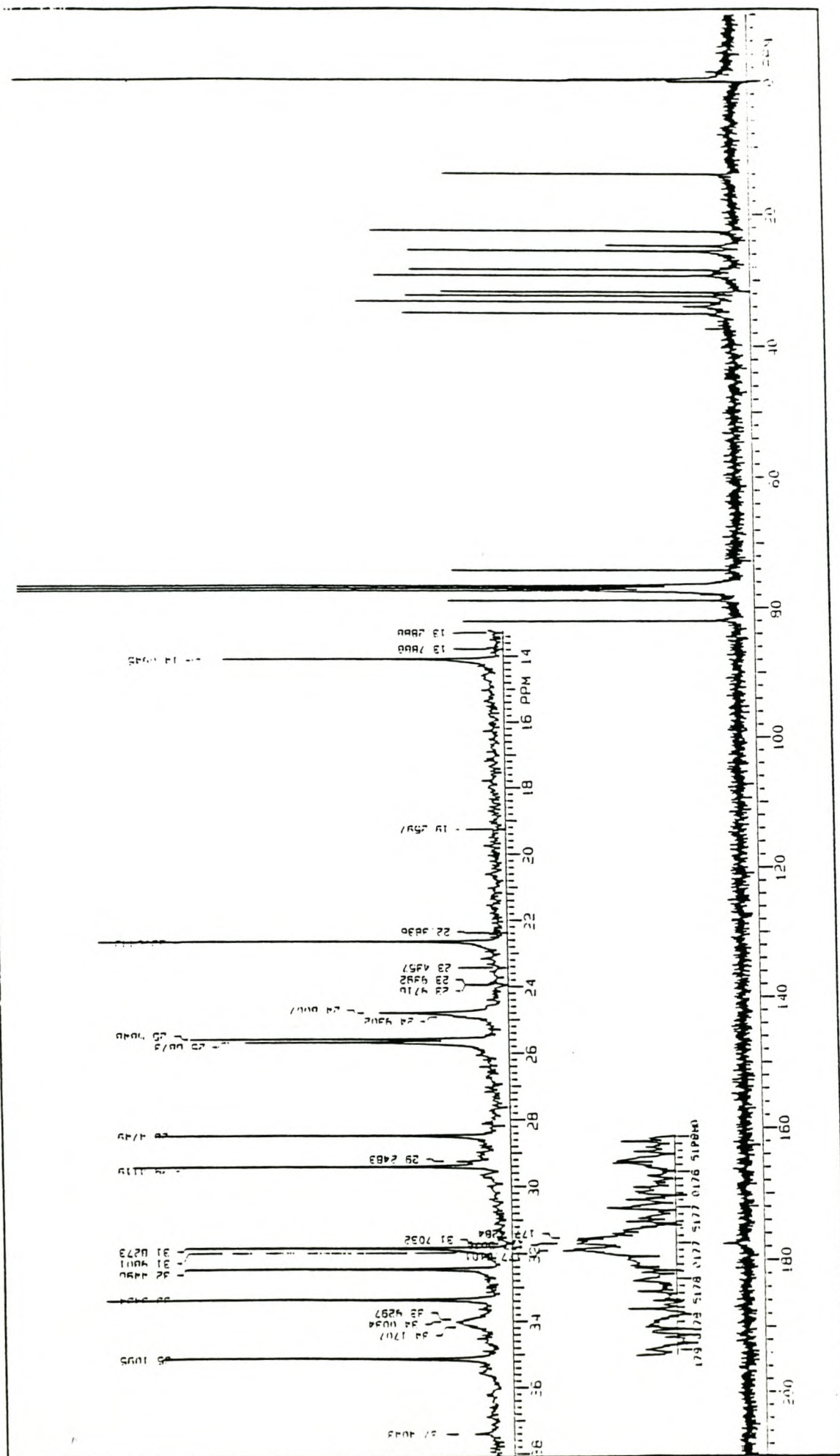


Figuur 2.81: Die TIC (A) en enkelioonstroomchromatogramme vir m/z 135 (B) en m/z 153 (C) van Fraksie 5 soos verkry uit die HPLC-skeiding.

EXPERIMENT IS OPGESTEL EN UITGEVOER DEUR : HSC SPIES
KMR-LABORATORIUM, UNIVERSITEIT VAN STELLENBOSCH

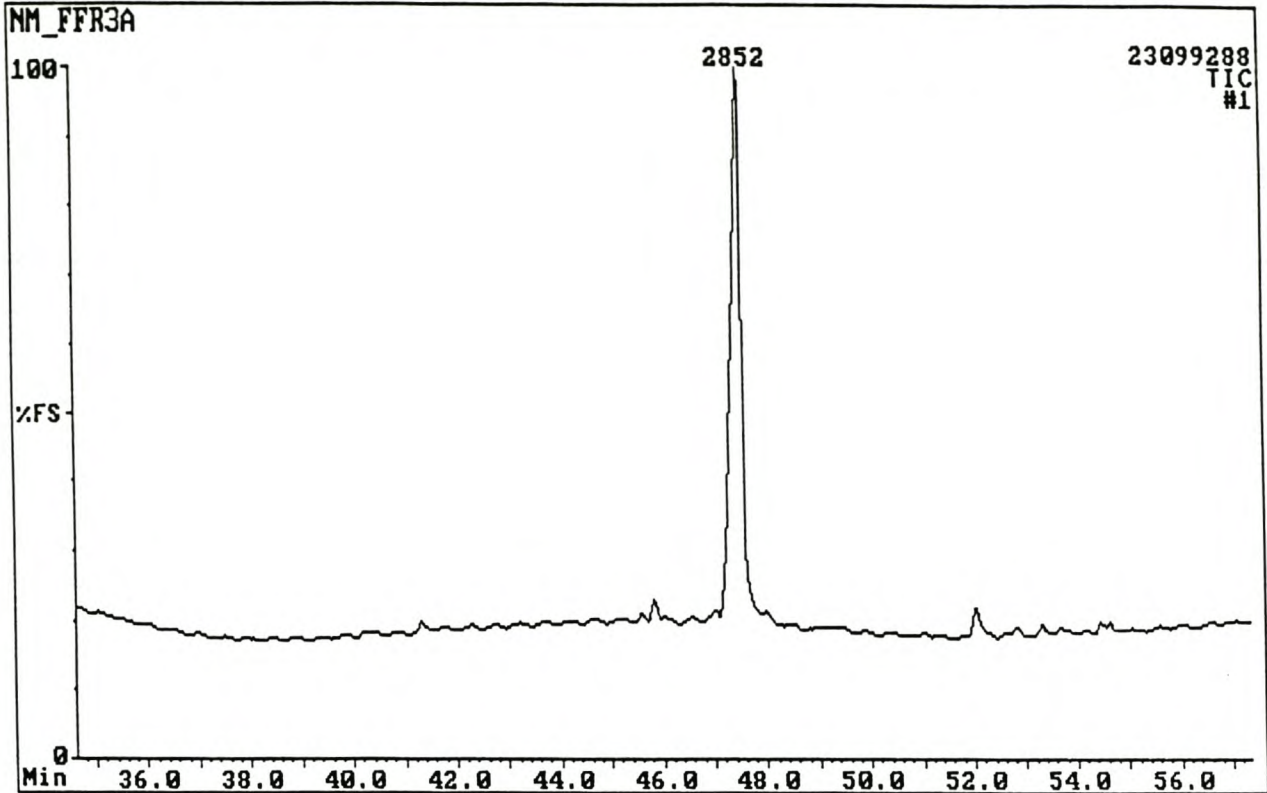


Figuur 2.82: ^{13}C -KMR spektrum van Fraksie 3 soos verkry uit HPLC-skeiding.



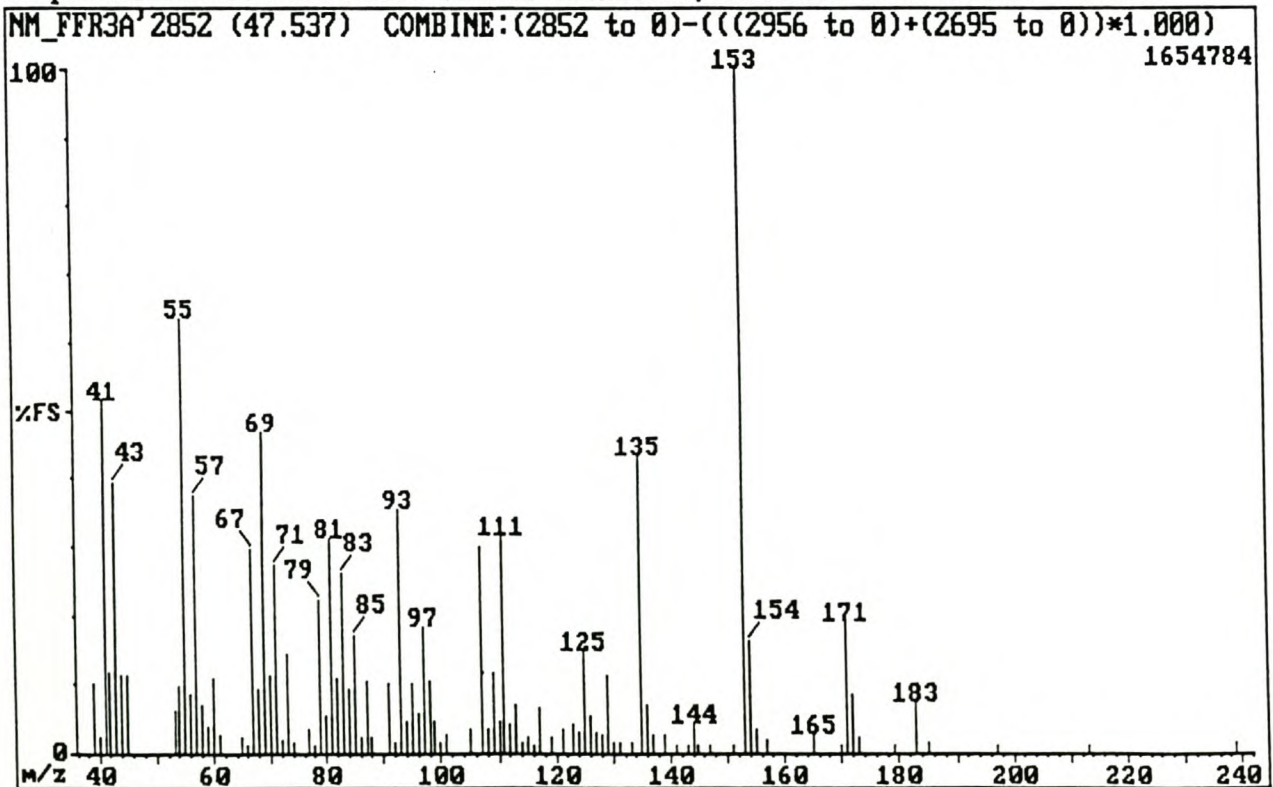
Figuur 2.83: ^{13}C -KMR spektrum van Fraksie 5 soos verkry uit HPLC-skeiding.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE SECRETION, FRACTION 3 EX HPLC @ 4 C/MIN



Figuur 2.84: TIC van Fraksie 3 (HPLC) voor hidrogenering. (GC-MS analise met 'n temperatuurprogram van 4°C/min van 40° tot 280°C).

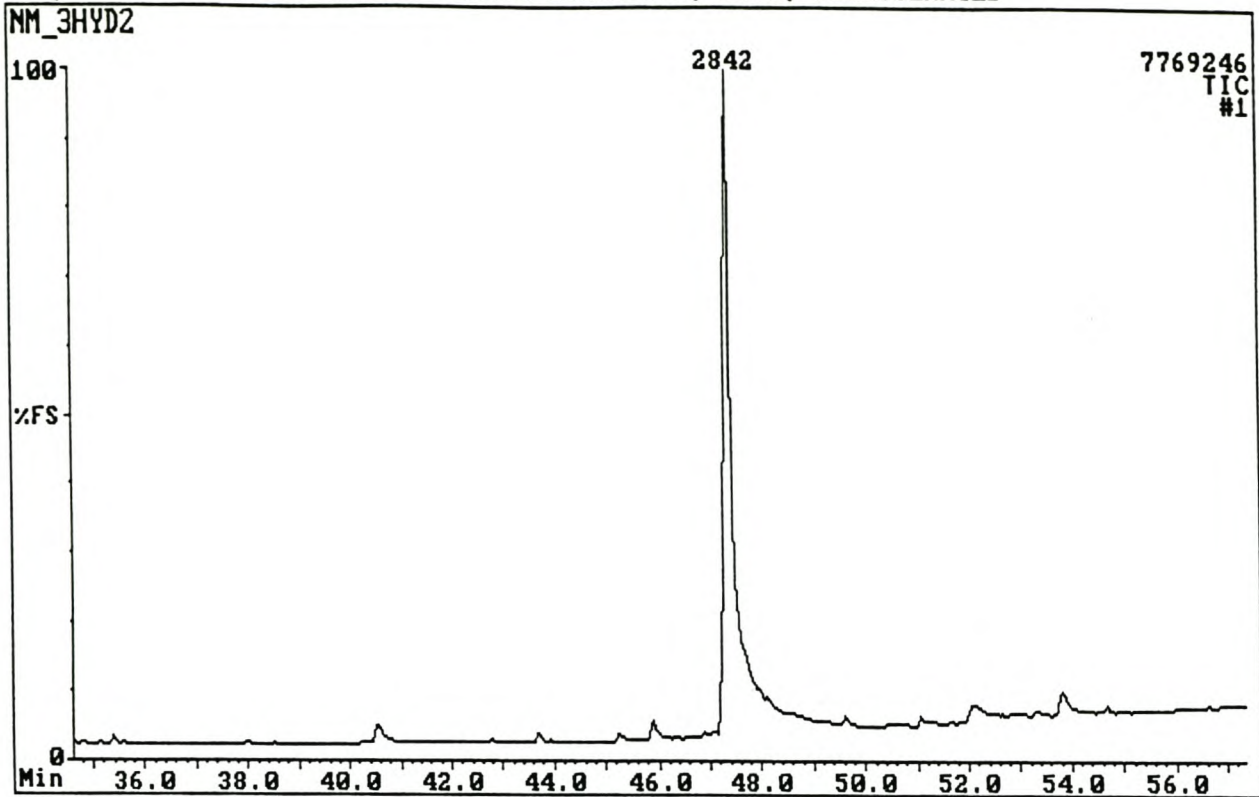
Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE SECRETION, FRACTION 3 EX HPLC @ 4 C/MIN



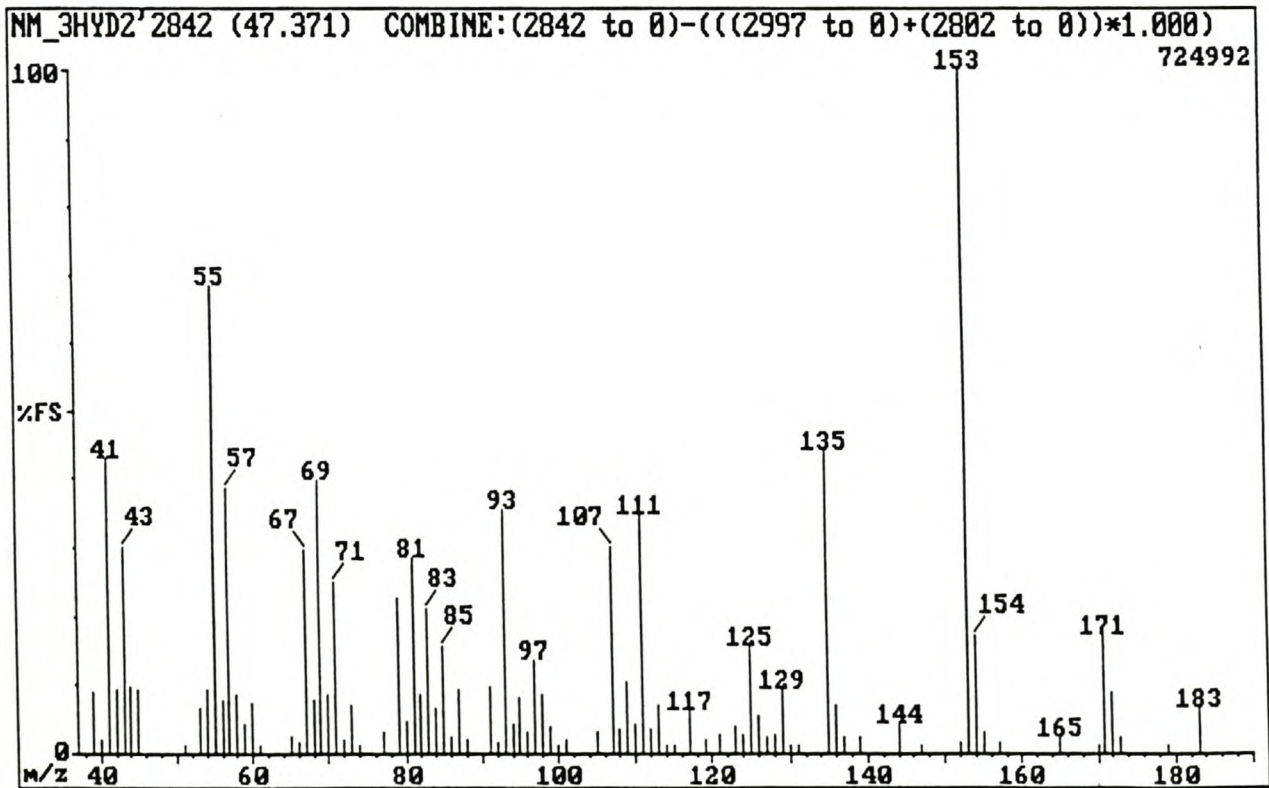
Figuur 2.85: EI-massaspektrum van die komponent 5009^o (kyk Fig. 2.84).

^o Nommer van die betrokke komponent in die oorspronklike TIC.

Sample: NEOTRAGUS MOSCHATUS: FEMALE SECRETION, FR 3, HYDROGENATED

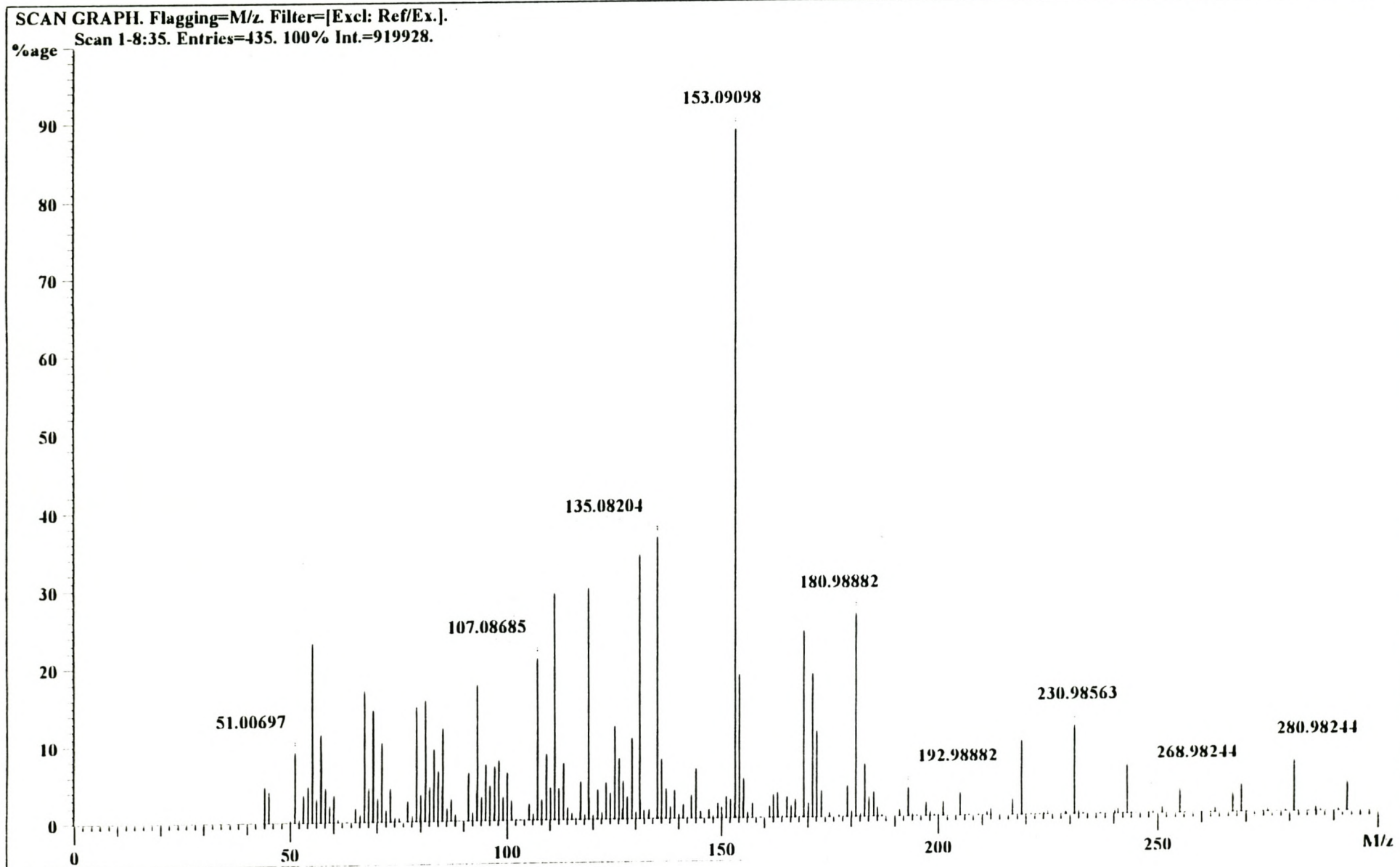


Figuur 2.86: TIC van Fraksie 3 (HPLC) na hidrogenering. (GC-MS analise met 'n temperatuurprogram van 4°C/min van 40° tot 280°C).

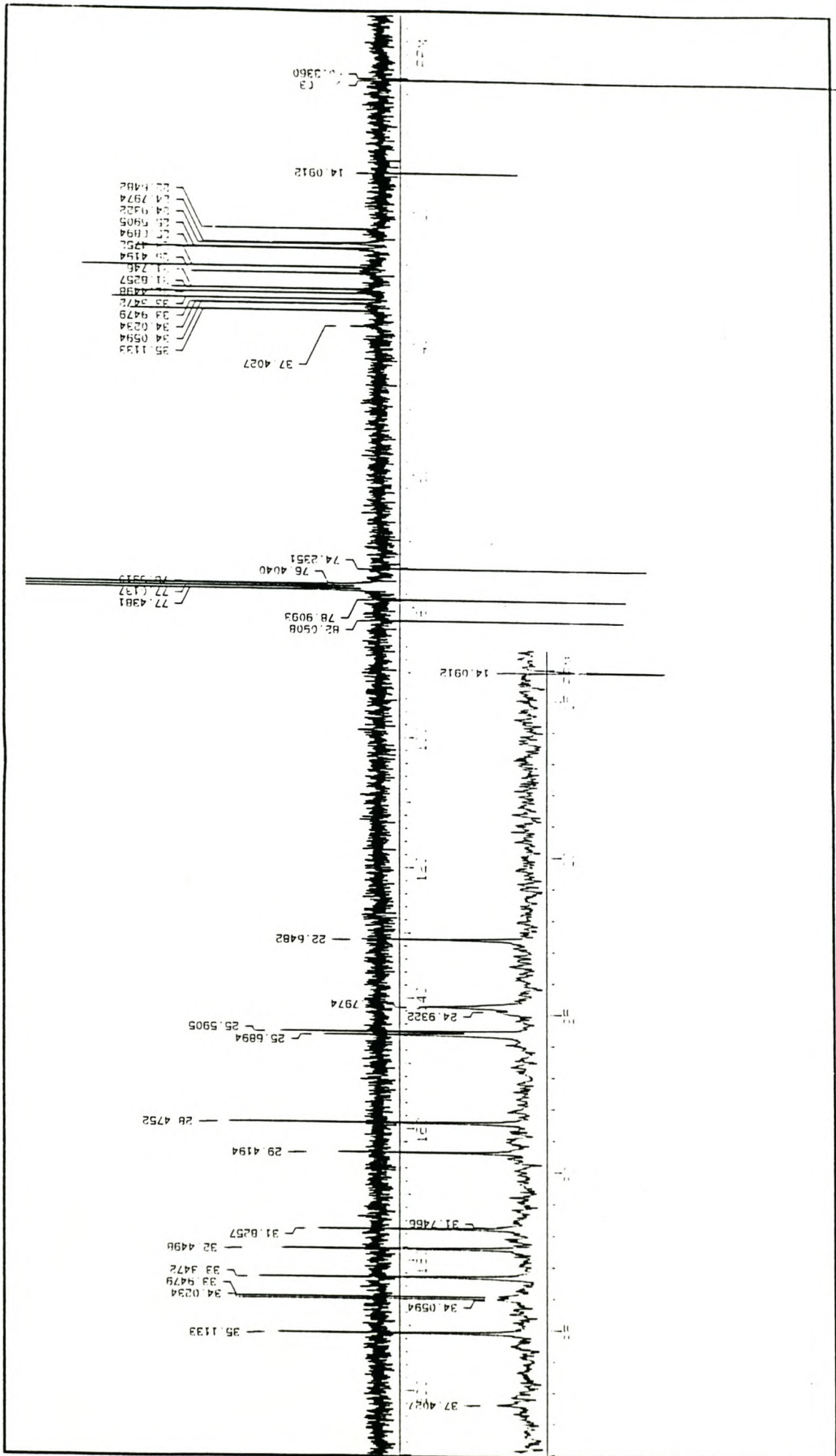


Figuur 2.87: EI-massaspektrum van komponent 5009^f (kyk Fig. 2.86).

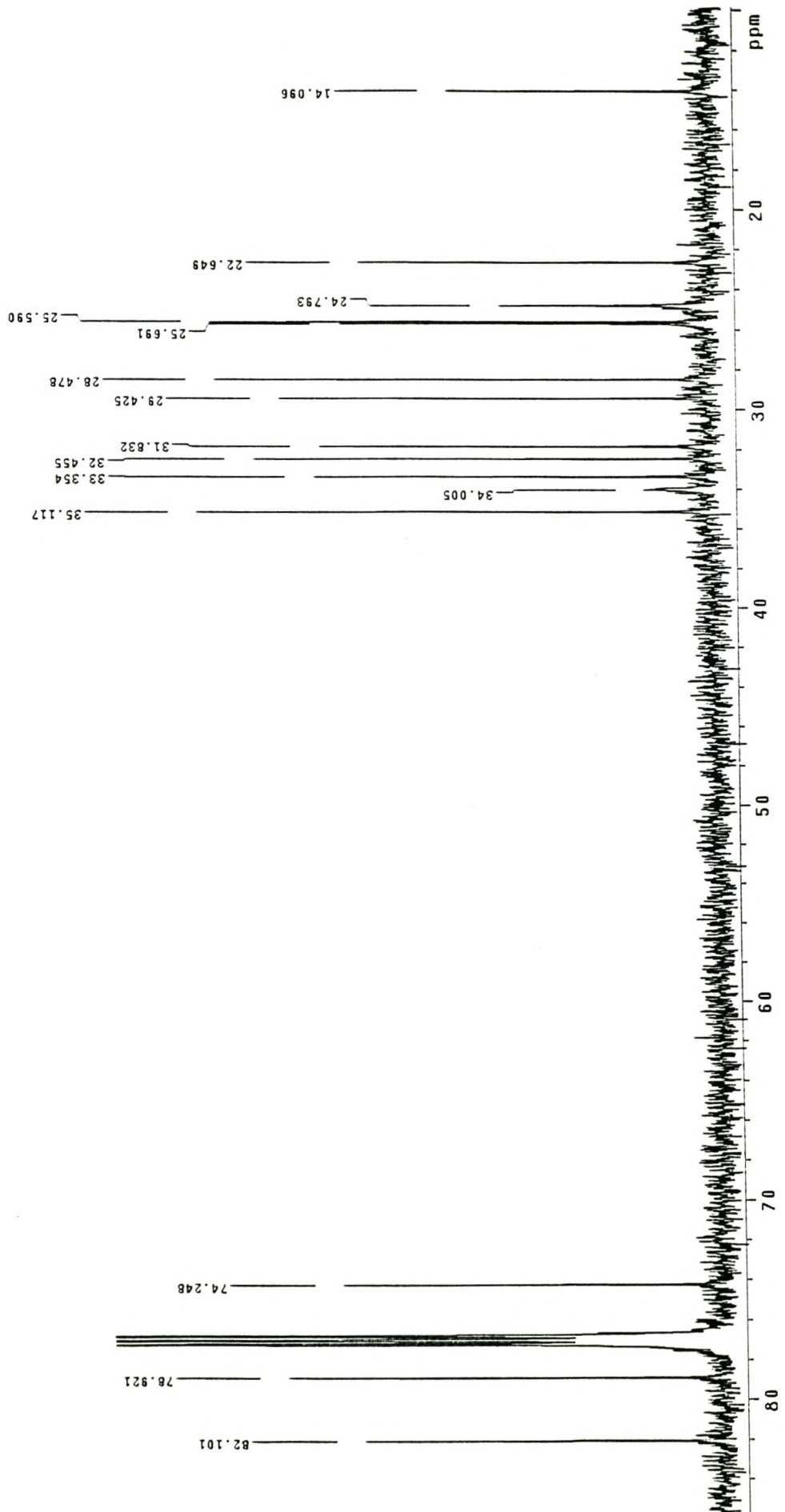
^f Nommer van die betrokke komponent in die oorspronklike TIC.



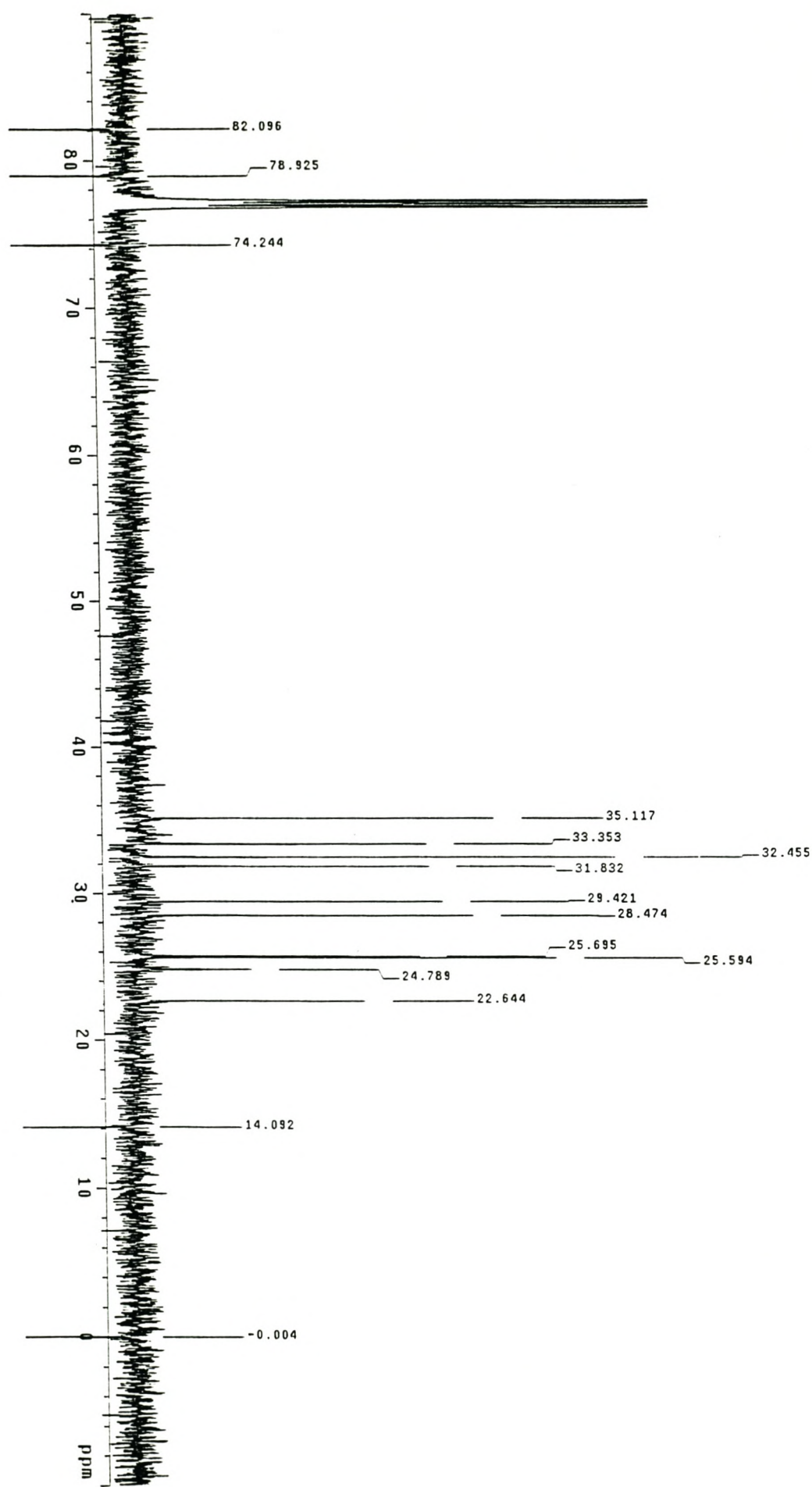
Figuur 2.88: Die HRMS van Fraksie 3 (HPLC).



Figuur 2.89: APT spektrum van Fraksie 5 soos verkry uit HPLC-skeiding (VXR 300).



Figuur 2.90: ^{13}C -KMR spektrum van Fraksie 5. (INOVA 600).



Figuur 2.91: APT spektrum van Fraksie 5. (INOVA 600).

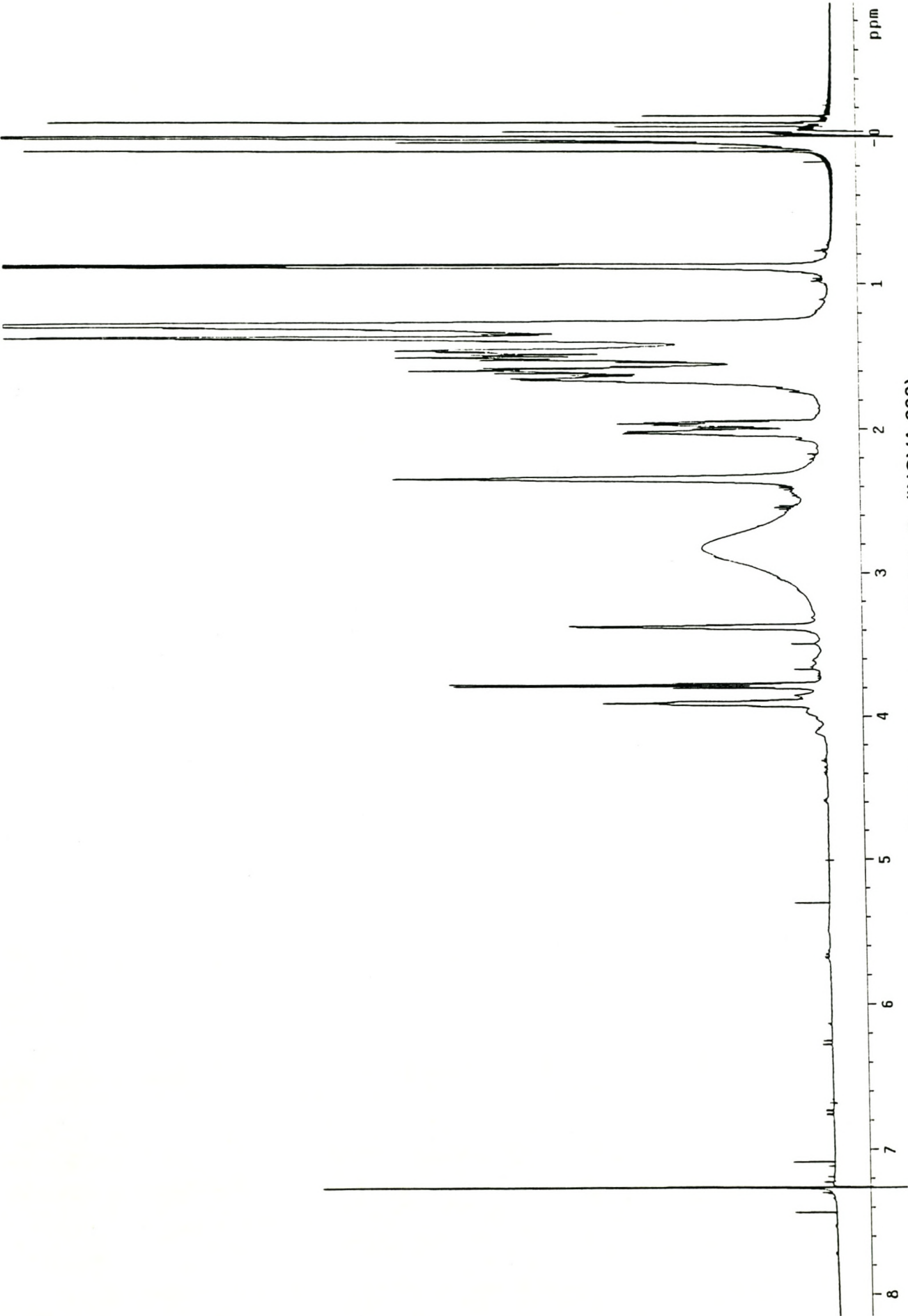


Fig 2.92: ^1H -KMR spektrum van Fraksie 5. (NOVA 600).

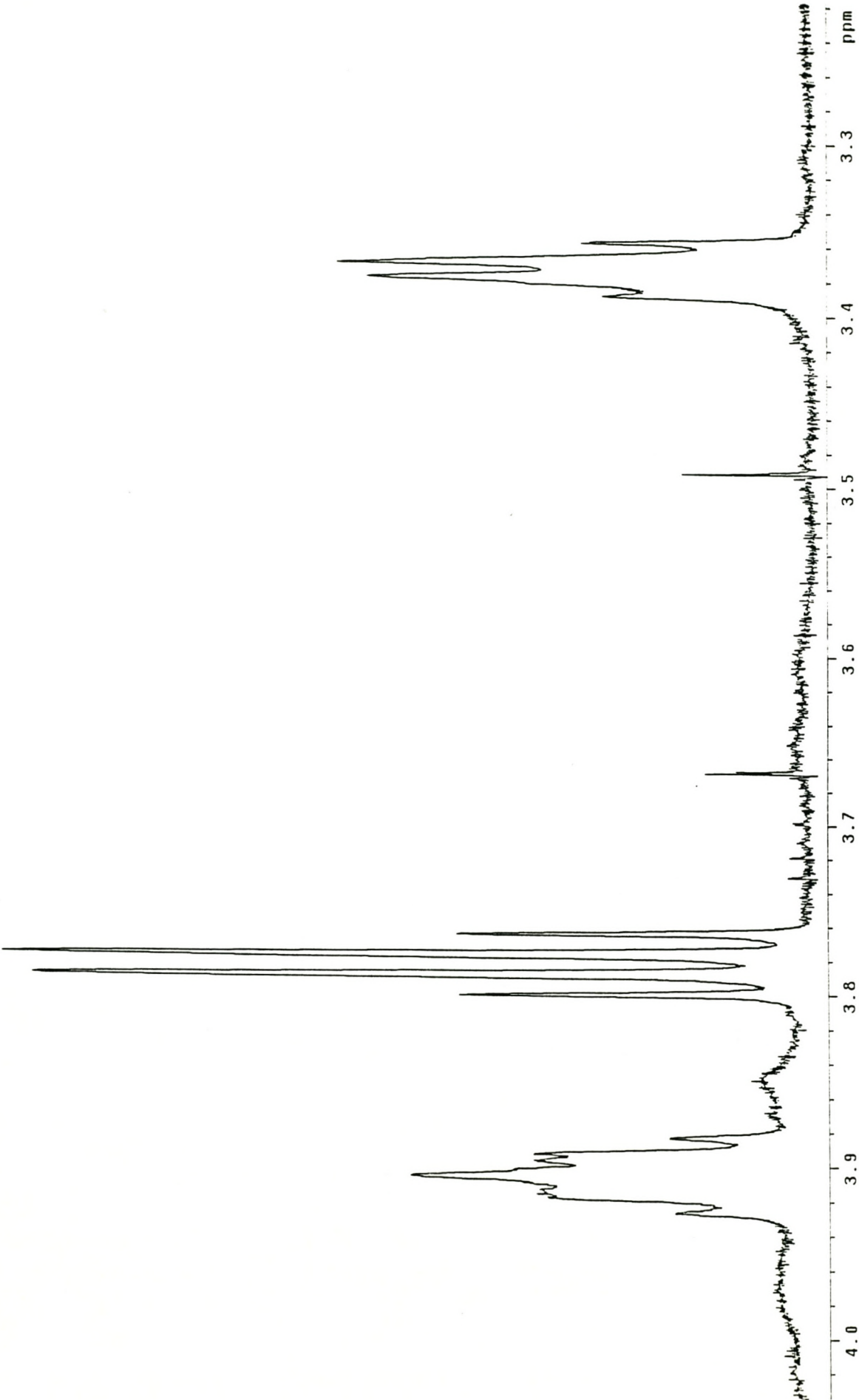


Fig 2.93a: ^1H -KMR spektrum (vergroting) van Fraksie 5. (INOVA 600).

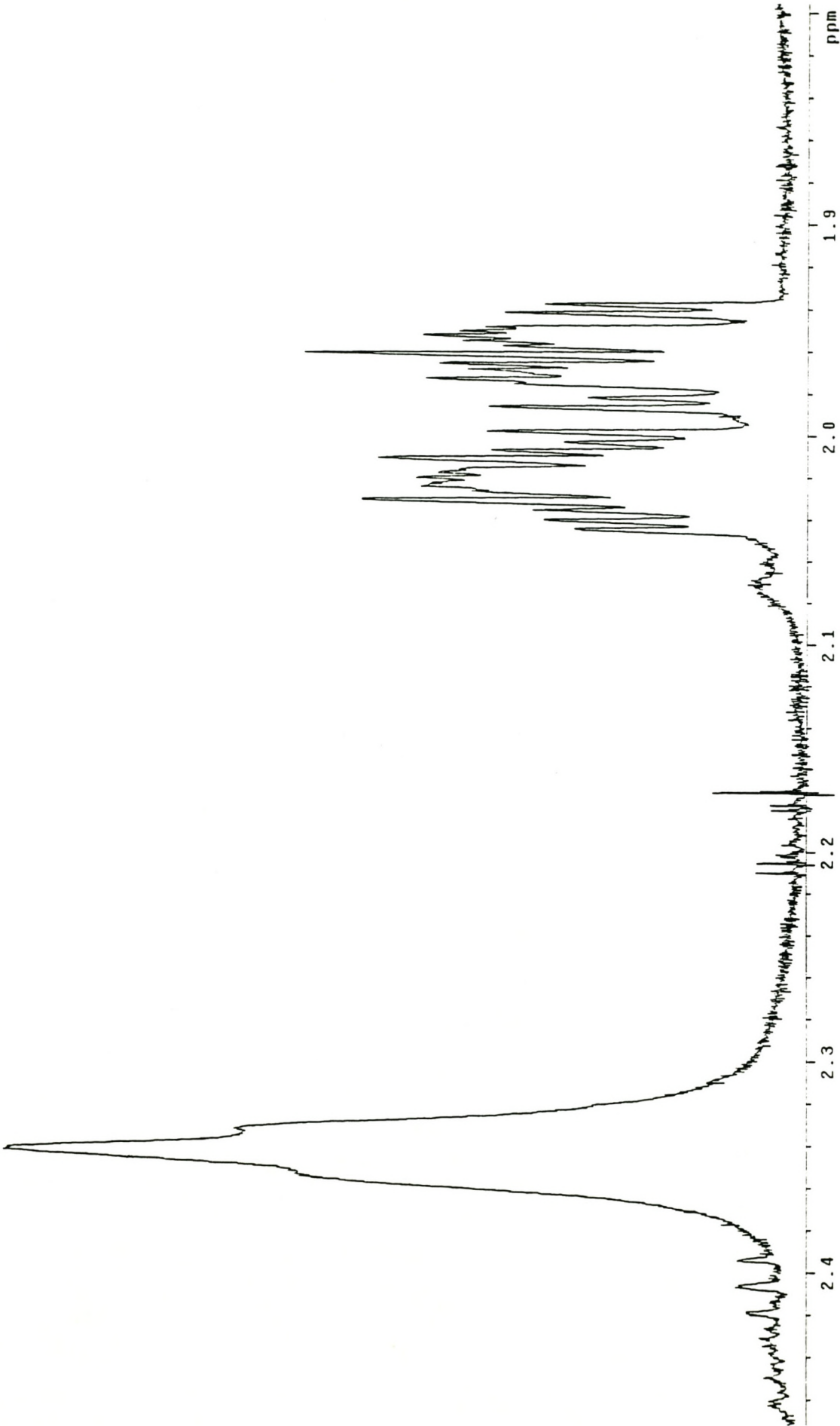


Fig 2.93b: ^1H -KMR spektrum (vergroting) van Fraksie 5. (INOVA 600).

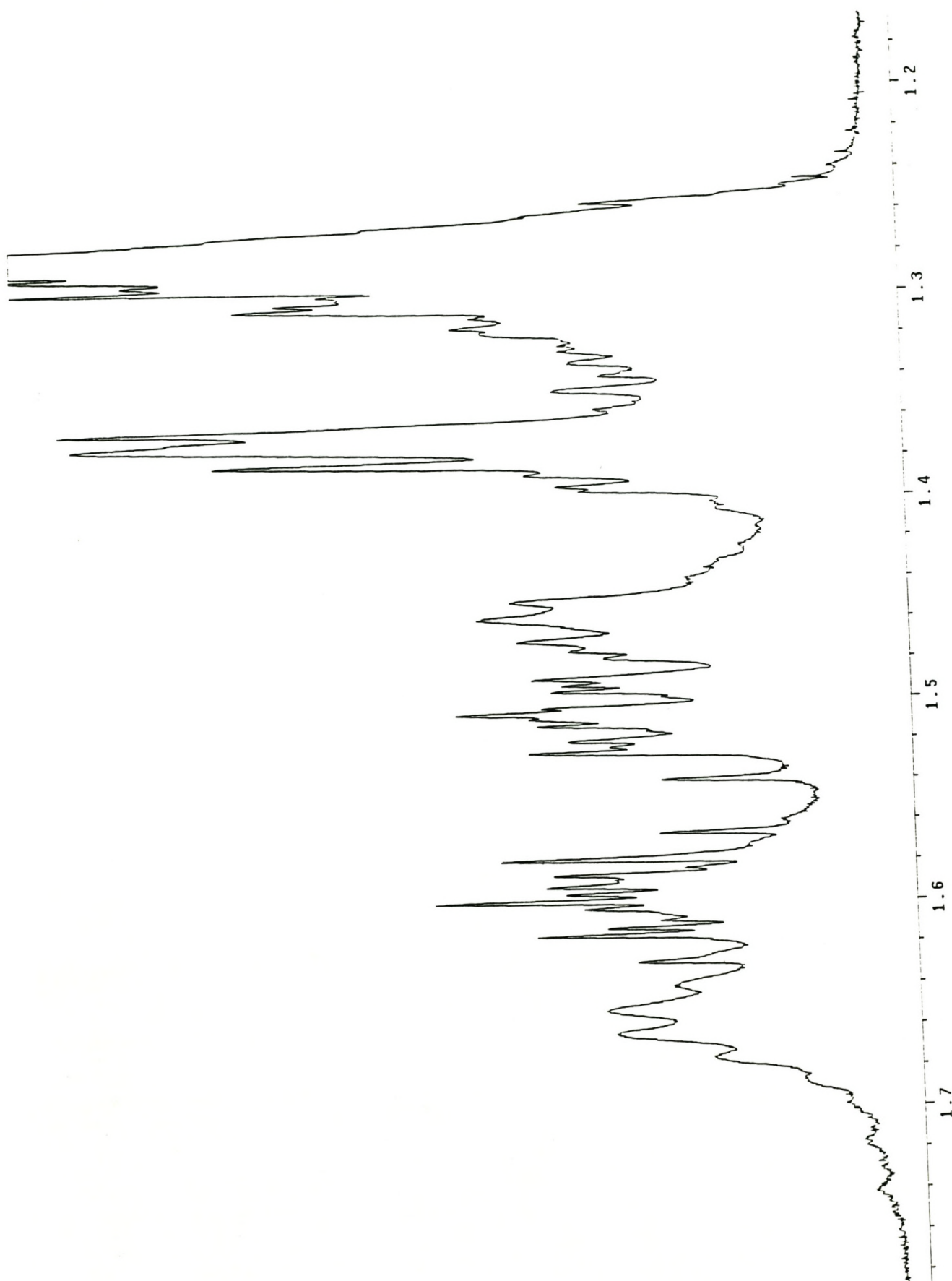


Fig 2.93c: ^1H -KMR spektrum (vergroting) van Fraksie 5. (INOVA 600).

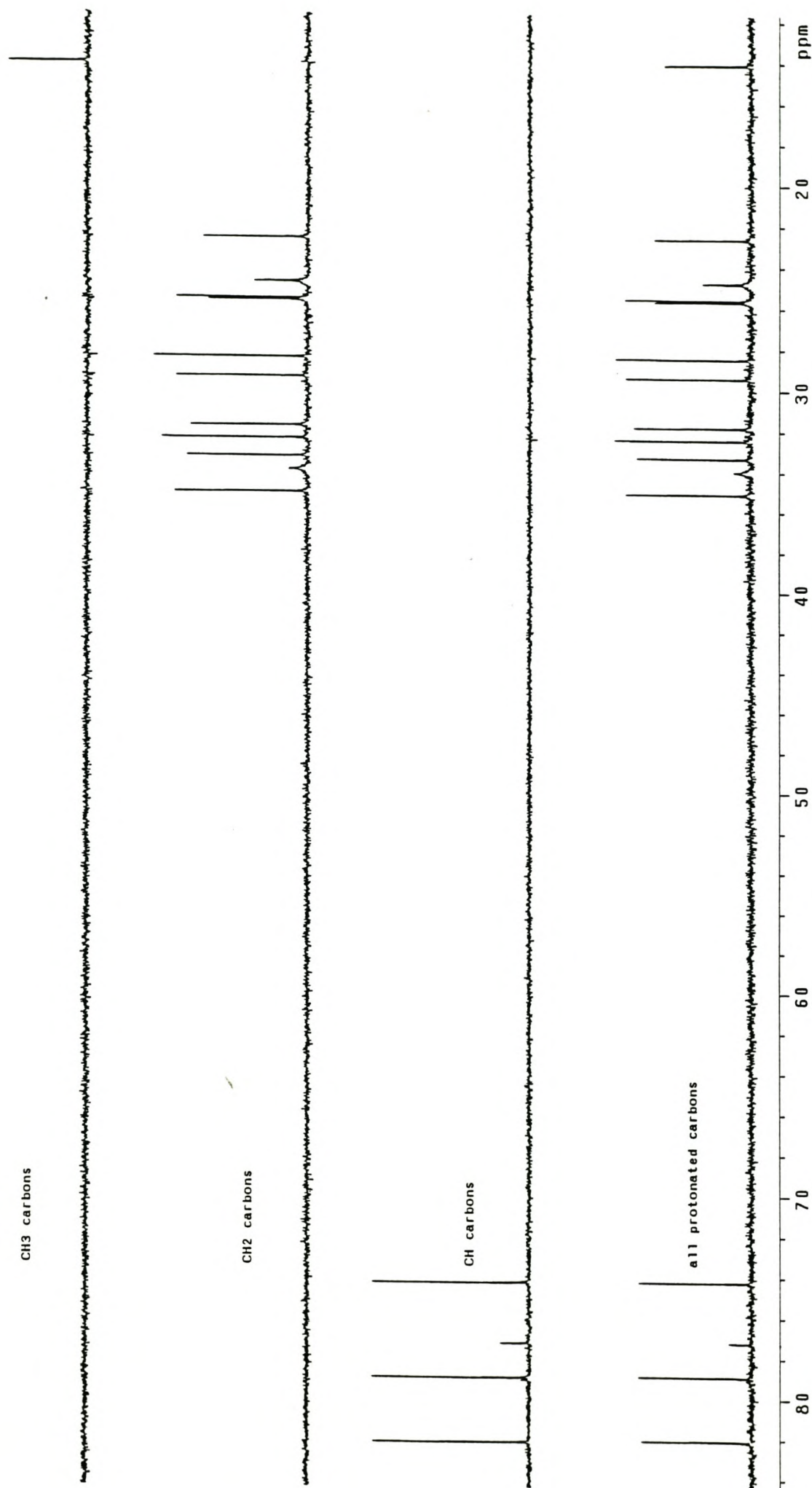
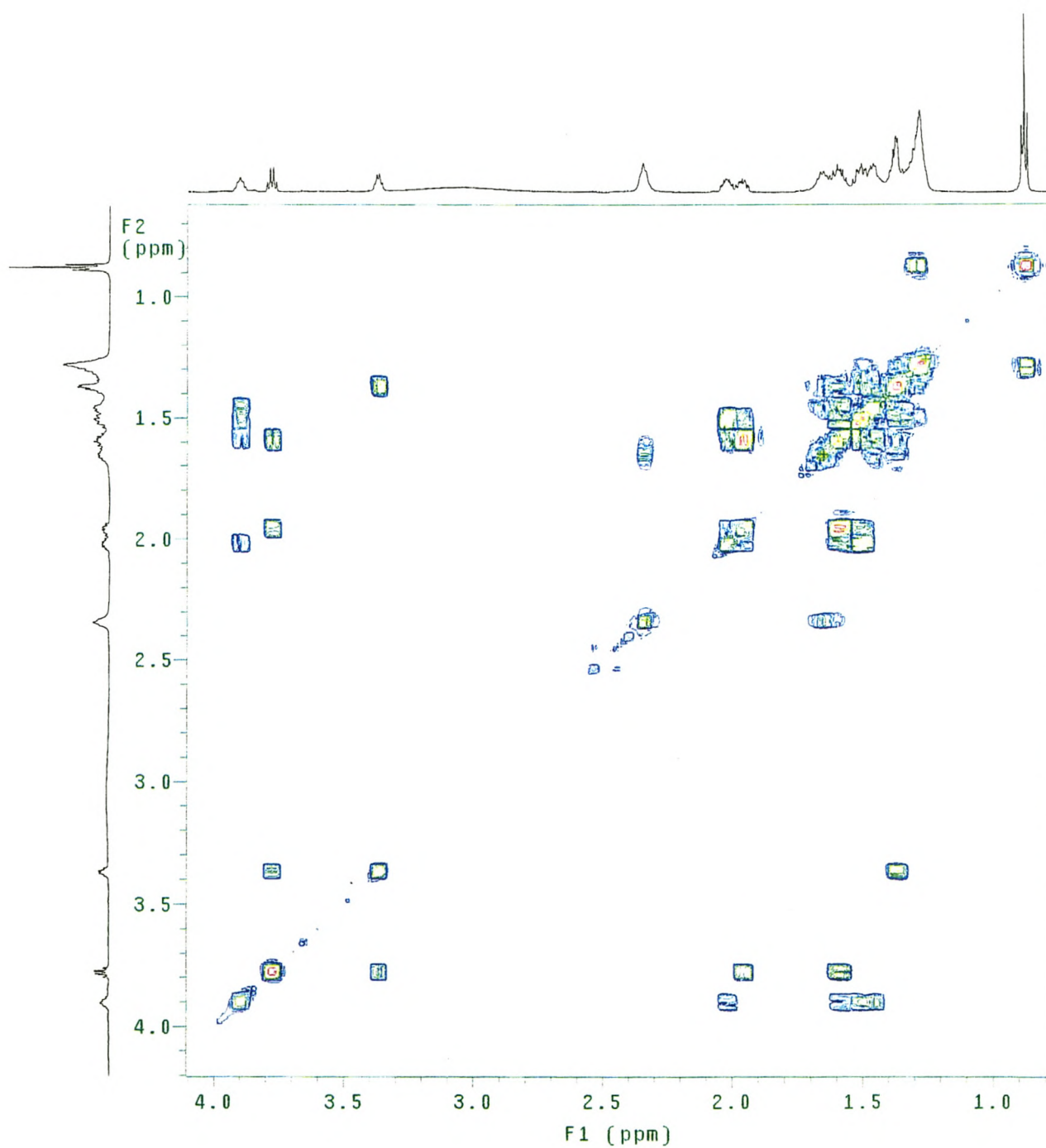
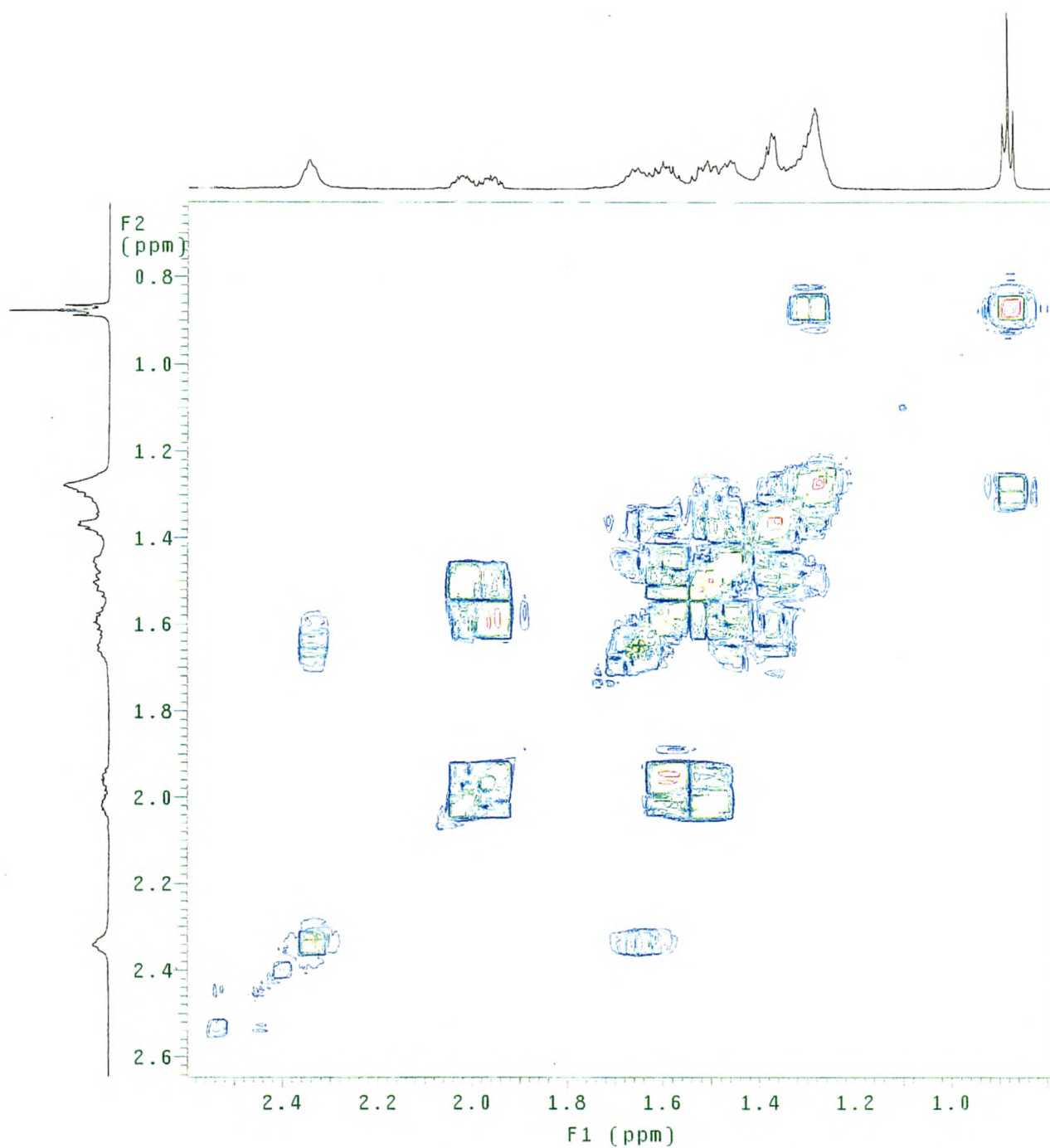


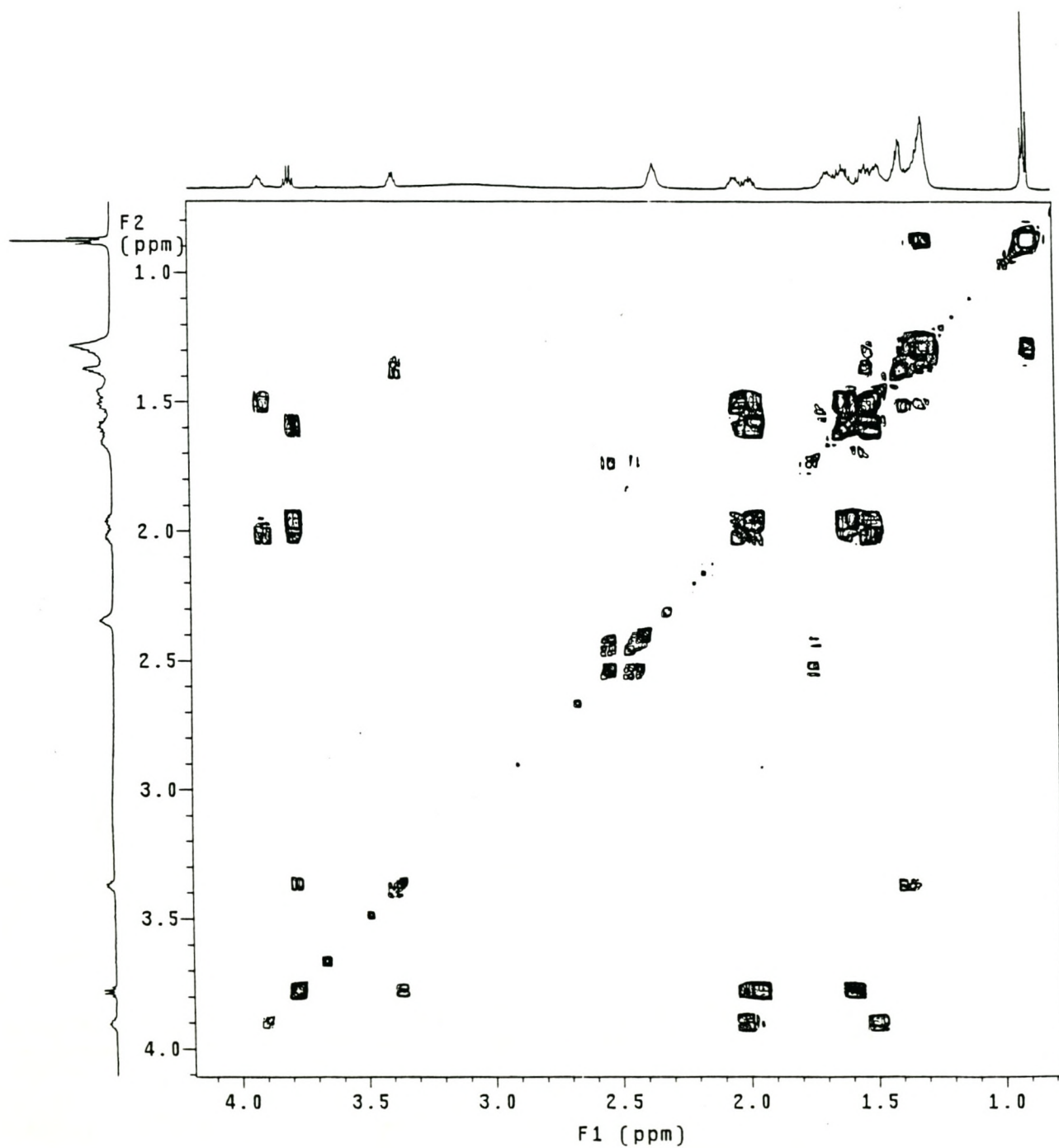
Fig. 2.94: DEPT-analyse van Fraksie 5 (HPLC).



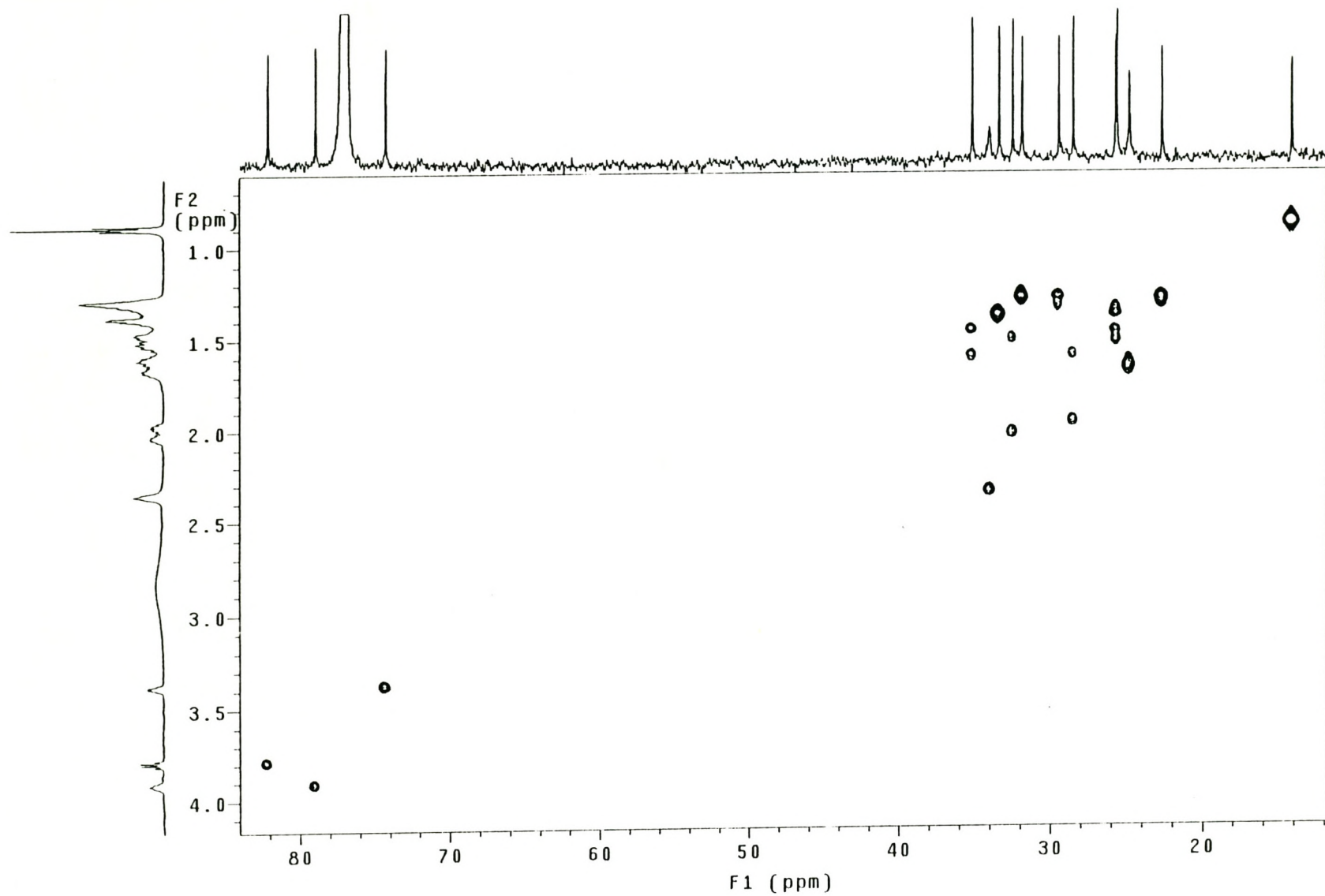
Figuur 2.95: 600 MHz 2D ^1H - ^1H COSY KMR-spektrum van Fraksie 5 (HPLC) in CDCl_3 .



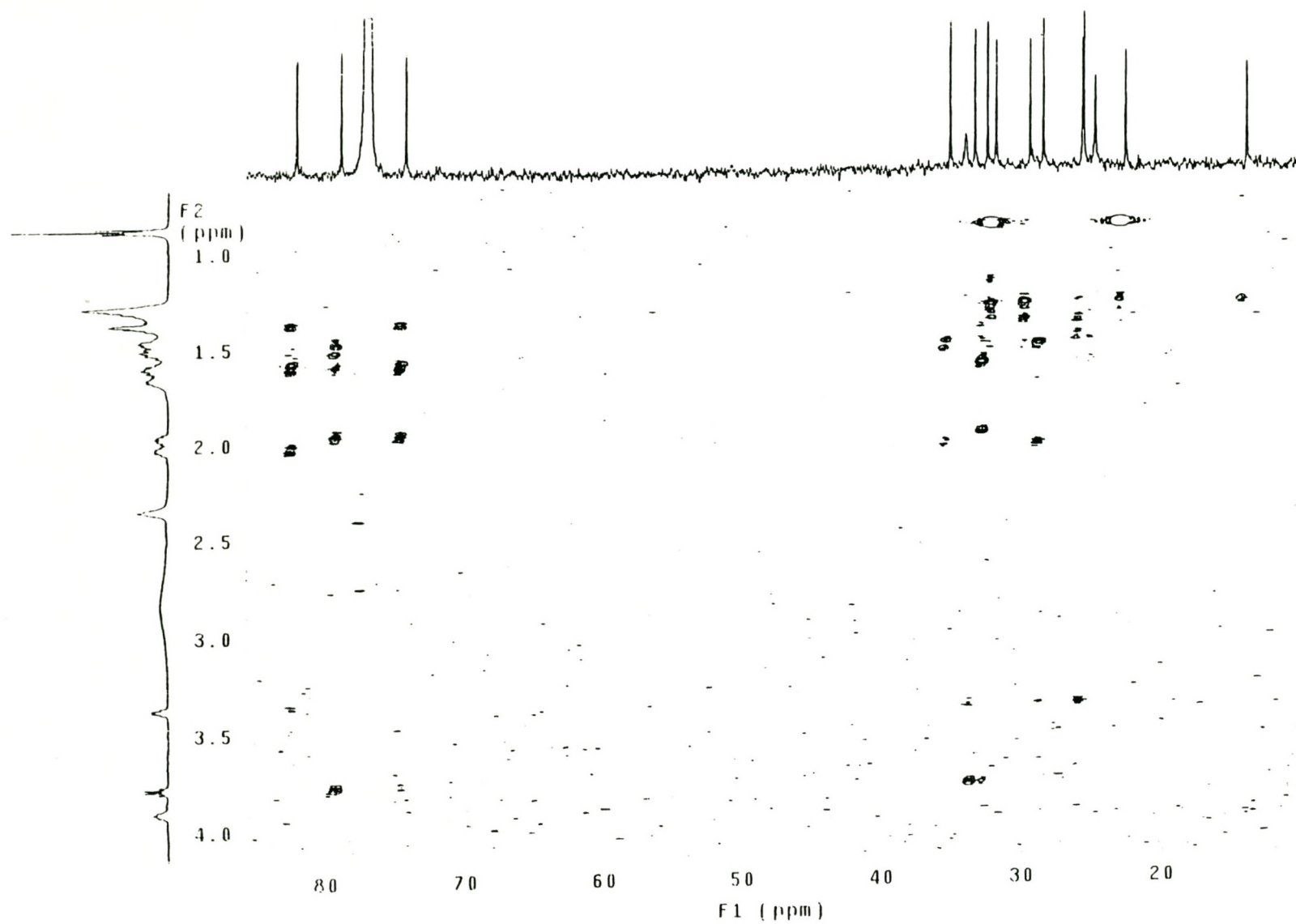
Figuur 2.96: 600 MHz 2D ^1H - ^1H COSY KMR-spektrum van Fraksie 5 (HPLC) in CDCl_3 . Vergroting van alifatiese gebied.



Figuur 2.97: 600 MHz 2D ^1H - ^1H COSY KMR-spektrum ($^2J_{\text{HH}}$ en $^3J_{\text{HH}}$) van Fraksie 5 (HPLC) in CDCl_3 .



Figuur 2.98: 600 MHz 2D ^1H - ^{13}C HSQC KMR spektrum van Fraksie 5 (HPLC) in CDCl_3 .



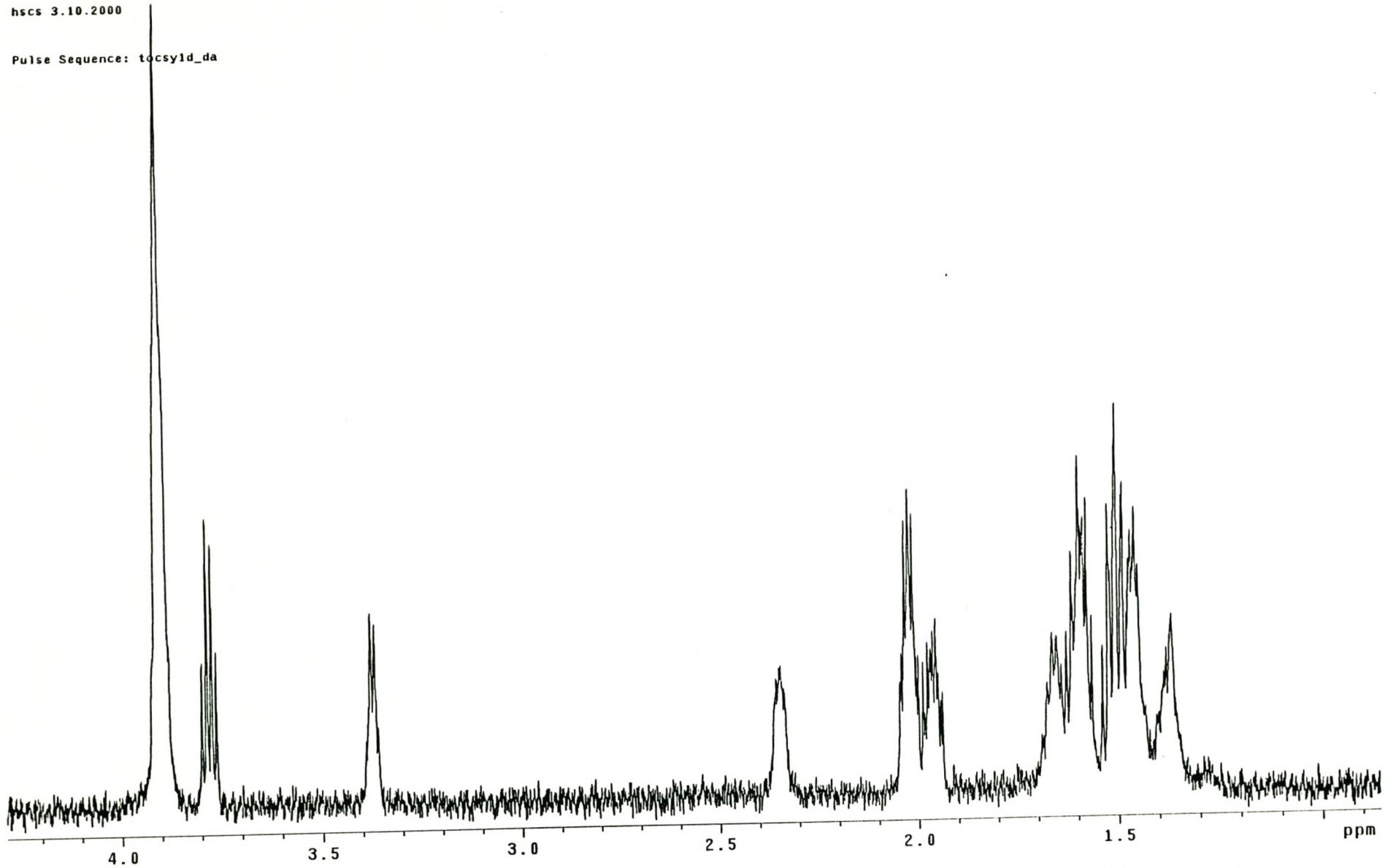
Figuur 2.99: 600 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC KMR spektrum van Fraksie 5 (HPLC) in CDCl_3 .

AS 011

sel. bestr. by 3.90 mix=.100

hscs 3.10.2000

Pulse Sequence: tocsy1d_da



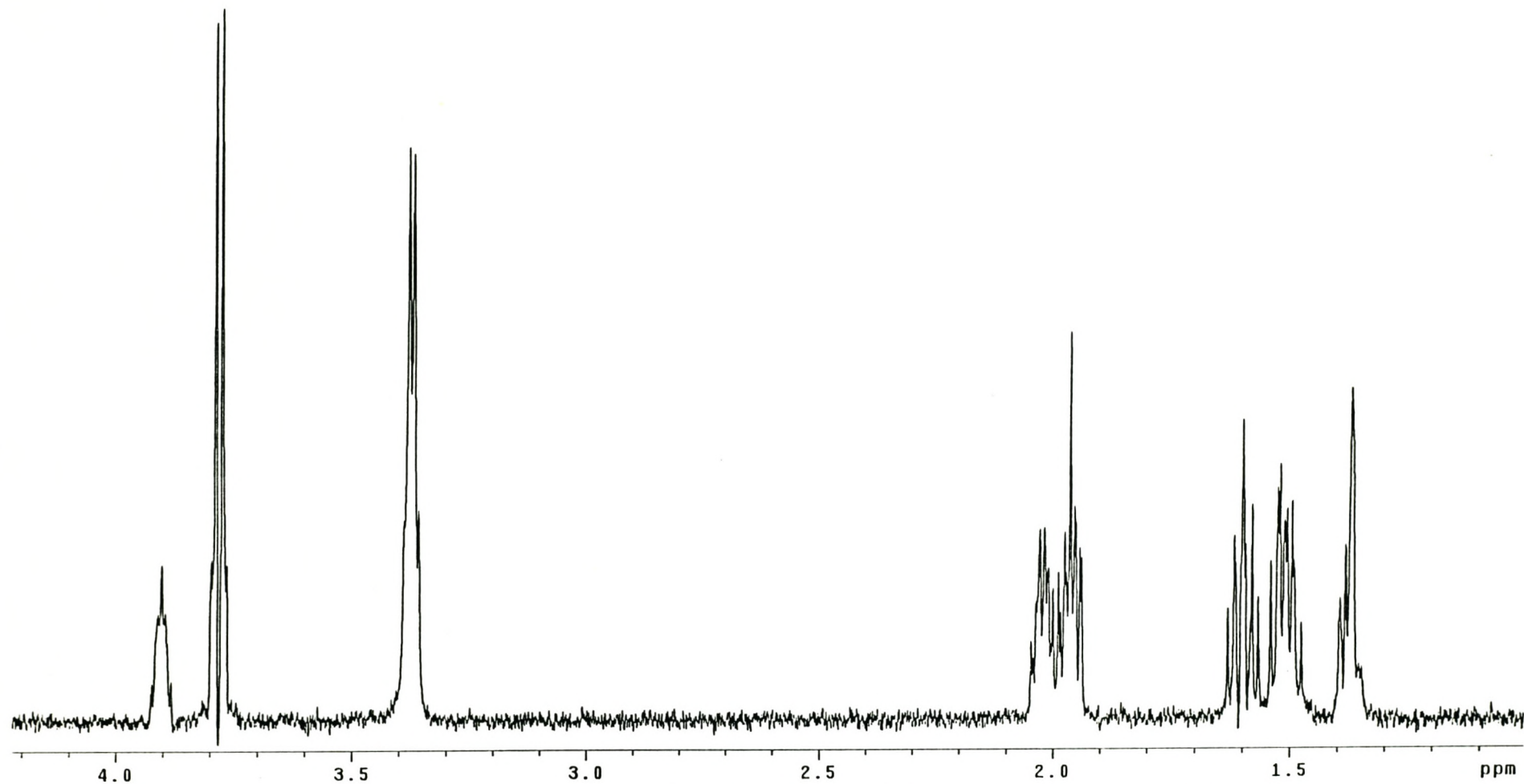
Figuur 2.100: 600 MHz 1D ¹H TOCSY KMR spektrum van Fraksie 5 met selektiewe bestraling by δ_H 3.91.

AS 011

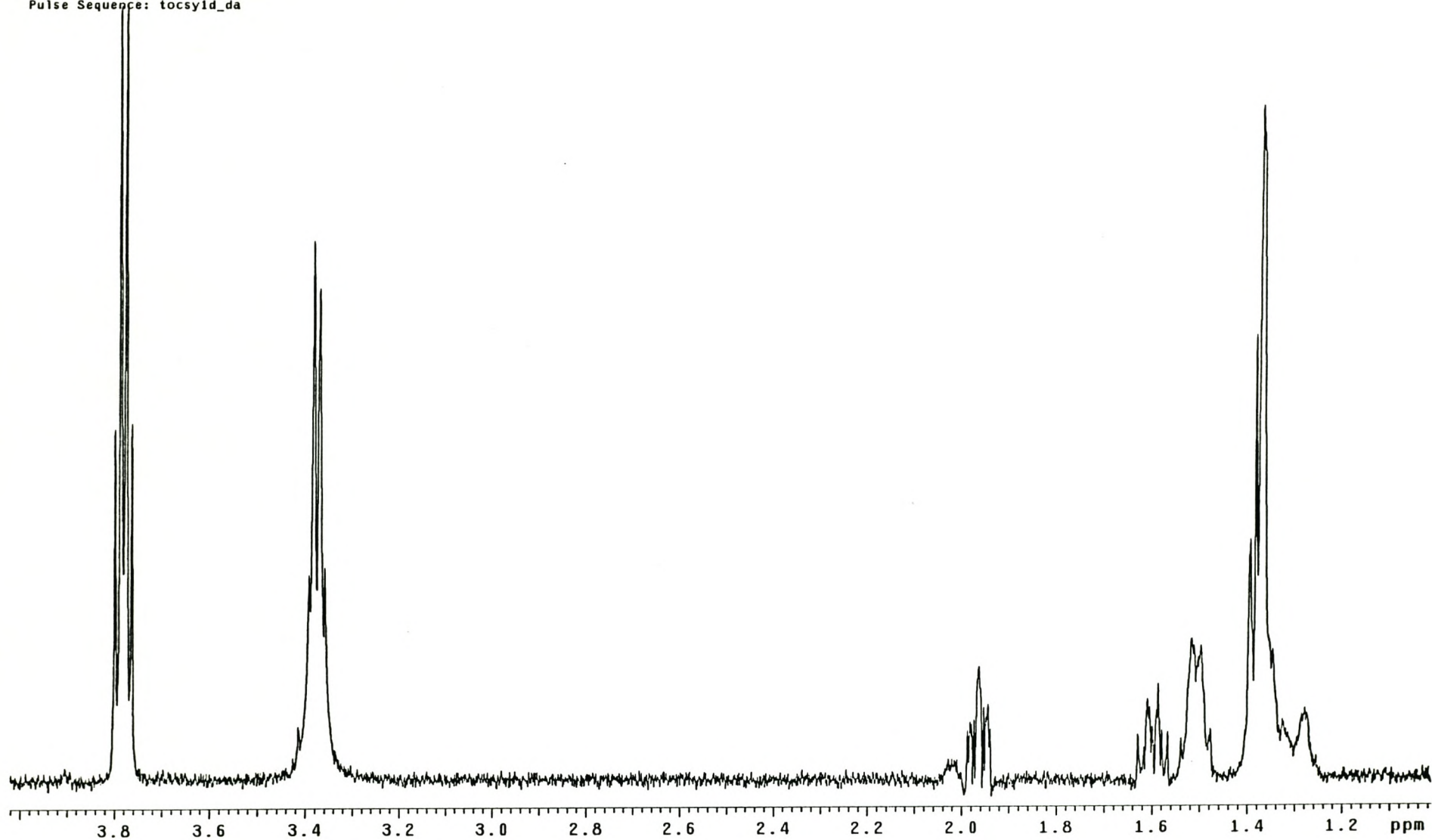
sel. bestr. by 3.78 dpm

hscs 18.10.2000

Pulse Sequence: tocsy1d_da



Figuur 2.101: 600 MHz 1D ¹H TOCSY KMR spektrum van Fraksie 5 met selektiewe bestraling by δ_H 3.78.



Figuur 2.102: 600 MHz 1D ¹H TOCSY KMR spektrum van Fraksie 5 met selektiewe bestraling by δ_H 3.38.

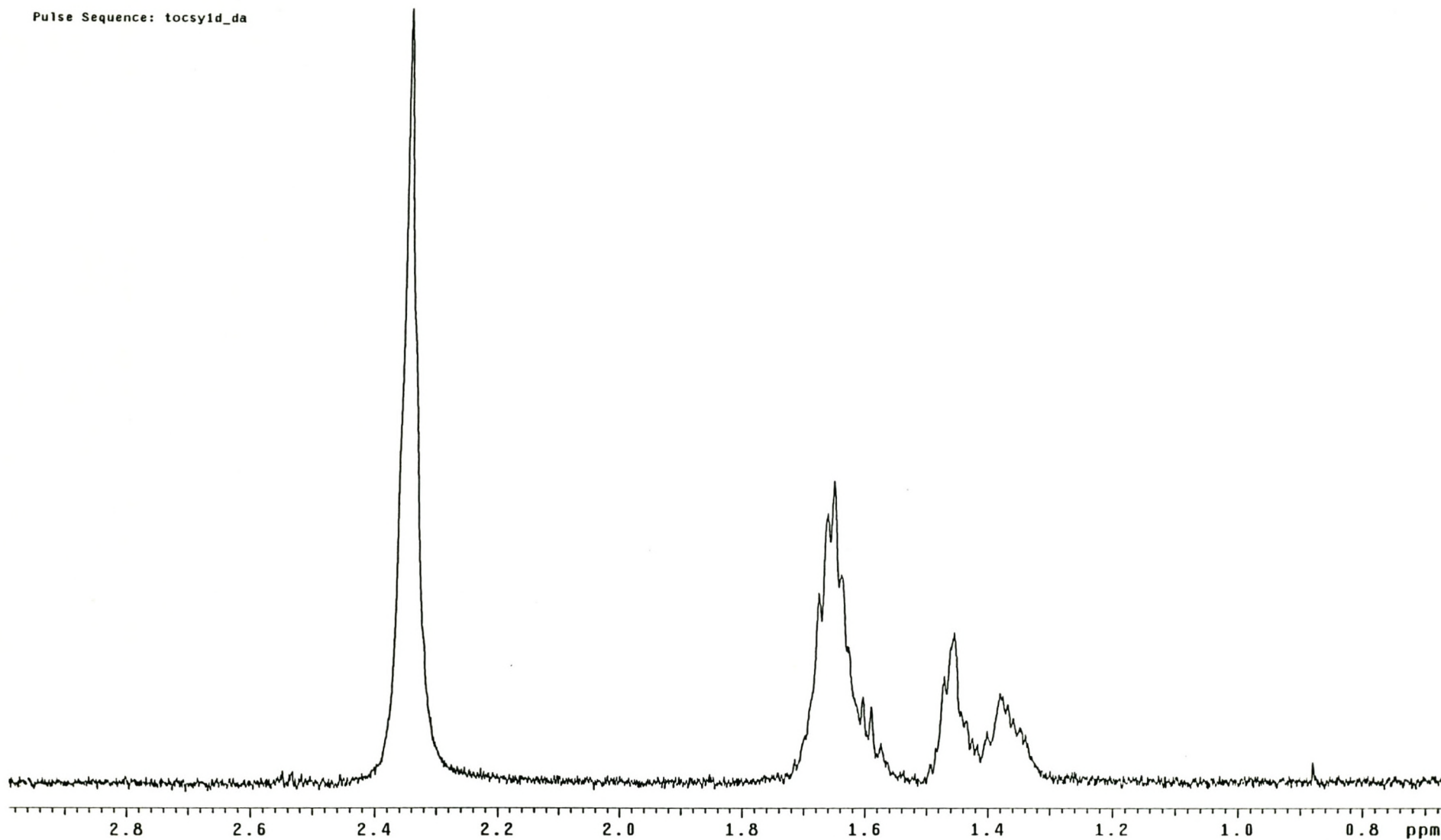
AS 011

5mm ID Probe

sel bestr by 2.35

hscs 19.10.2000

Pulse Sequence: tocsy1d_da



Figuur 2.103: 600 MHz 1D ¹H TOCSY KMR spektrum van Fraksie 5 met selektiewe bestraling by δ_H 2.35.

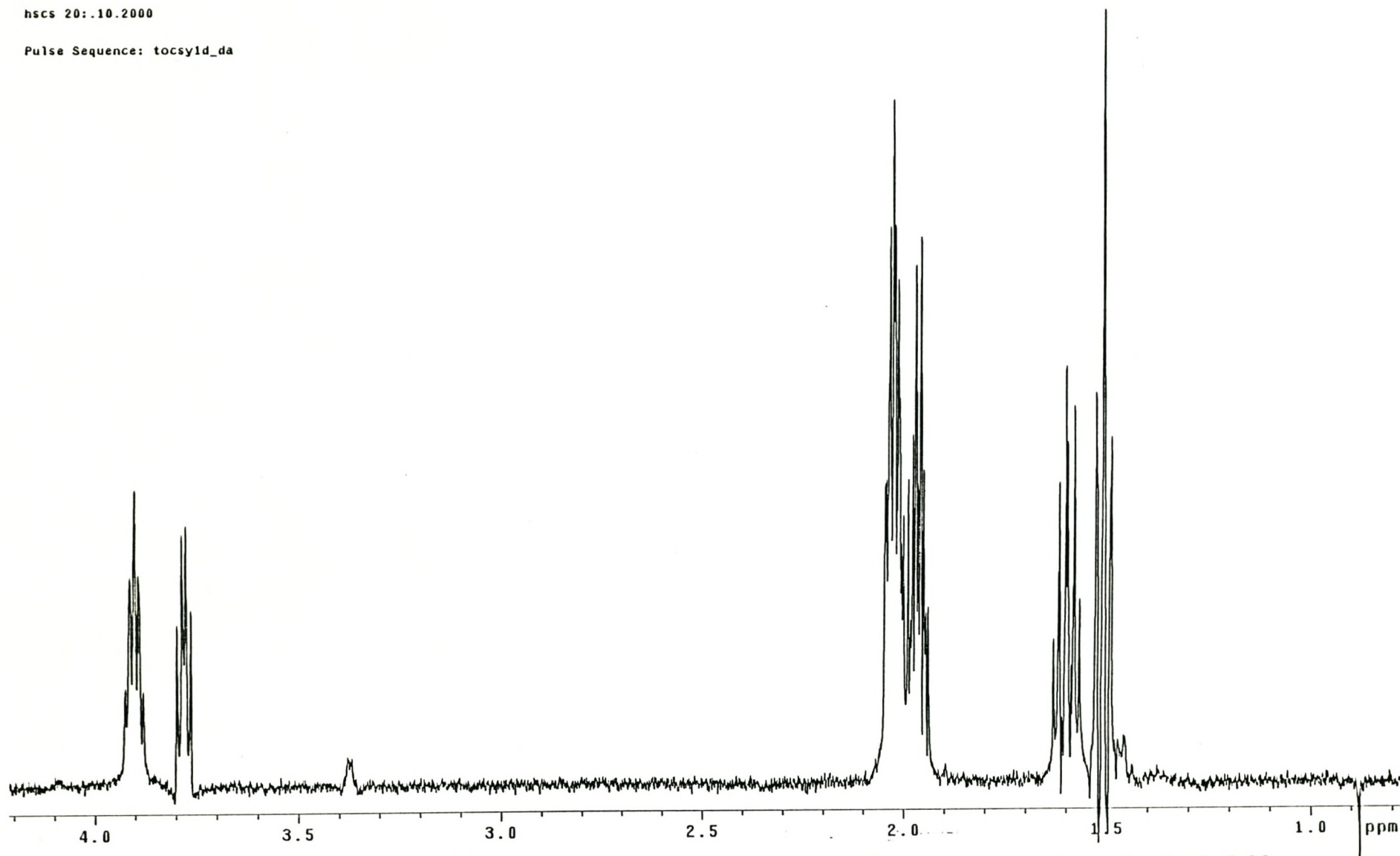
AS 011

5mm ID Probe

sel bestr by 2.03

hscs 20:10.2000

Pulse Sequence: tocsy1d_da



Figuur 2.104: 600 MHz 1D ¹H TOCSY KMR spektrum van Fraksie 5 met selektiewe bestraling by δ_H 2.02.

AS 011

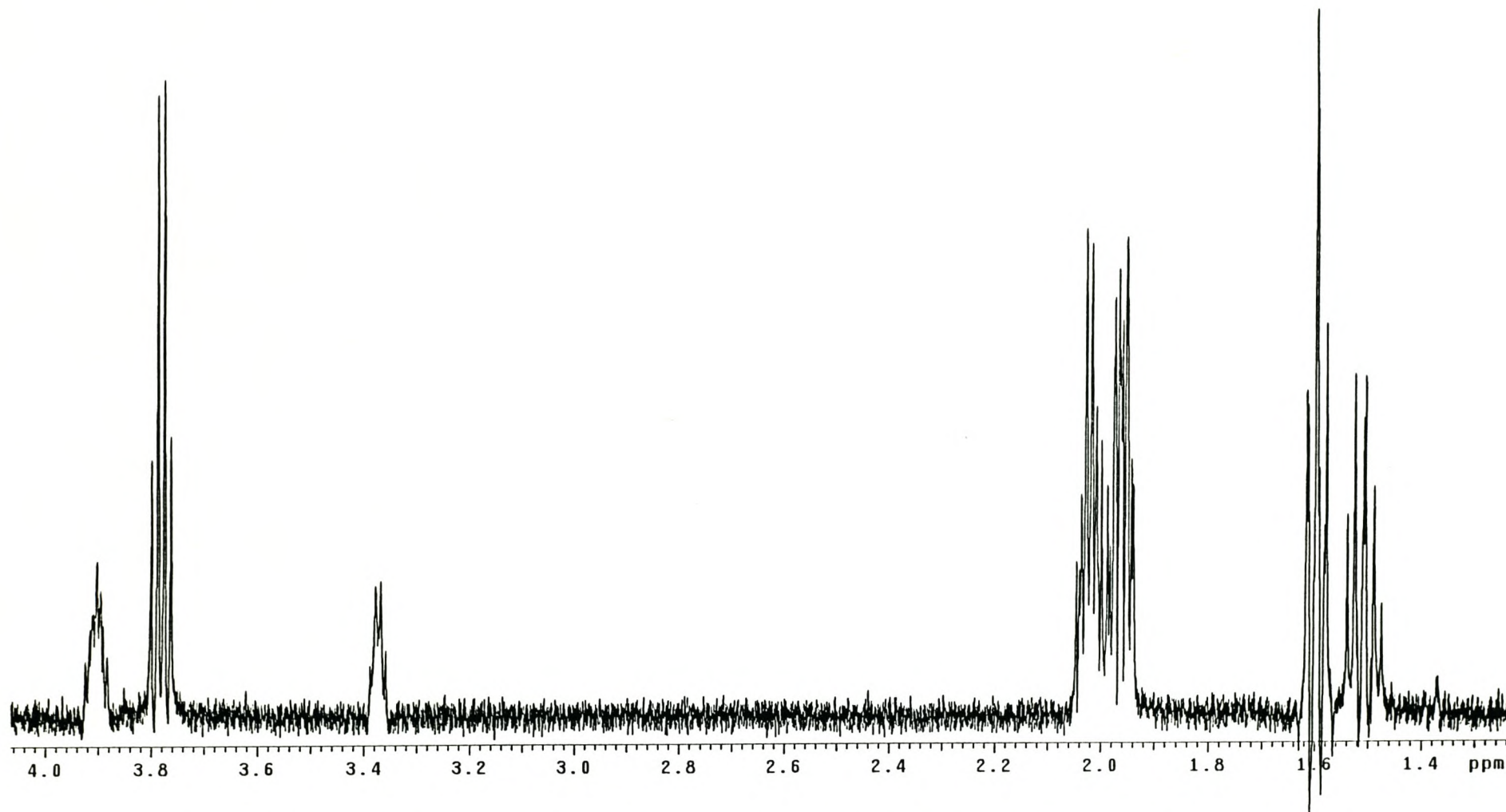
5mm ID Probe

sel bestr by 1.96

hscs 20.10.2000

Pulse Sequence: tocsy1d_da

Stellenbosch University <http://scholar.sun.ac.za>



Figuur 2.105: 600 MHz 1D ¹H TOCSY KMR spektrum van Fraksie 5 met selektiewe bestraling by δ_H 1.96.

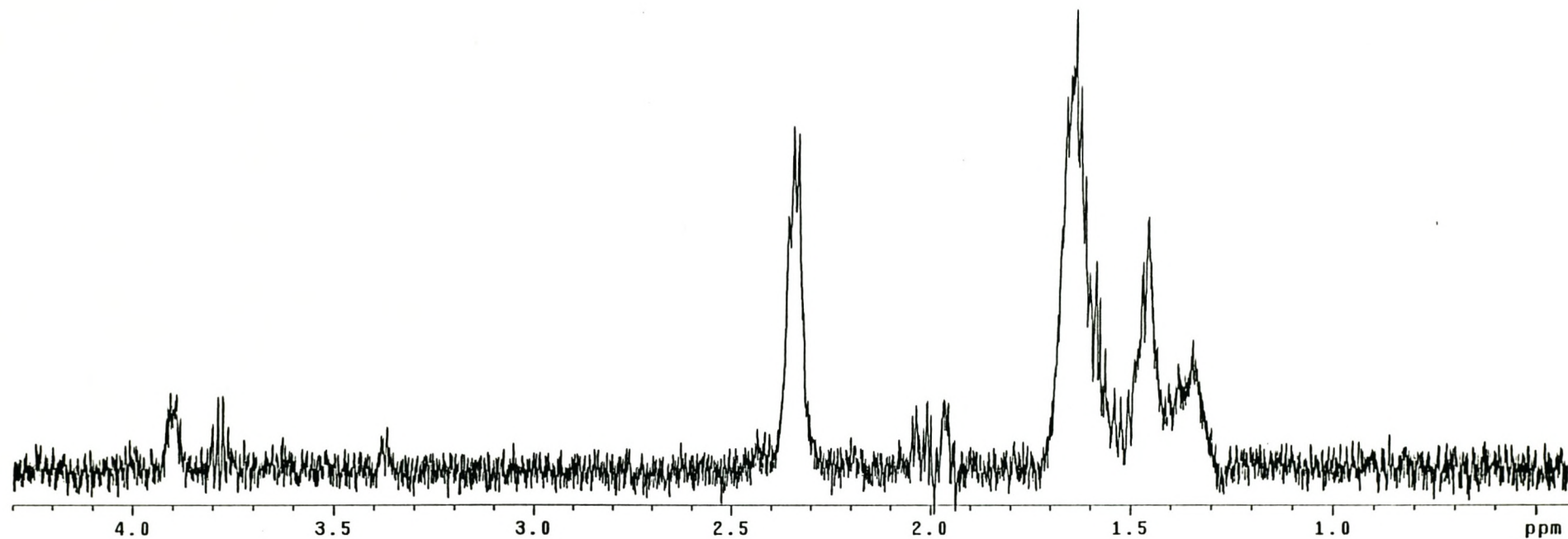
AS 011

5mm ID Probe

sel bestr by 1.66

hscs 20.10.2000

Pulse Sequence: tocsy1d_da



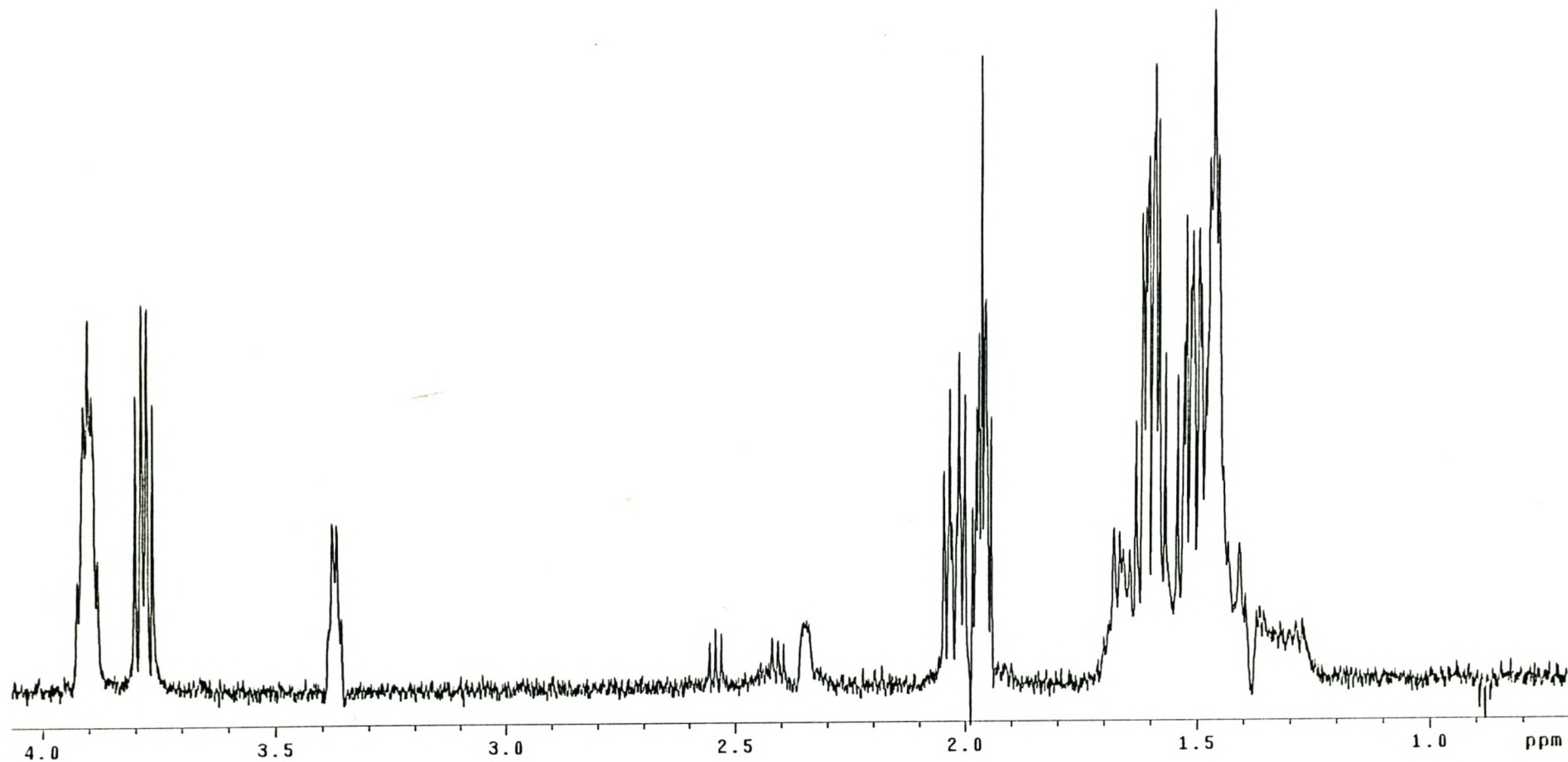
Figuur 2.106: 600 MHz 1D ¹H TOCSY KMR spektrum van Fraksie 5 met selektiewe bestraling by δ_H 1.66.

5mm ID Probe

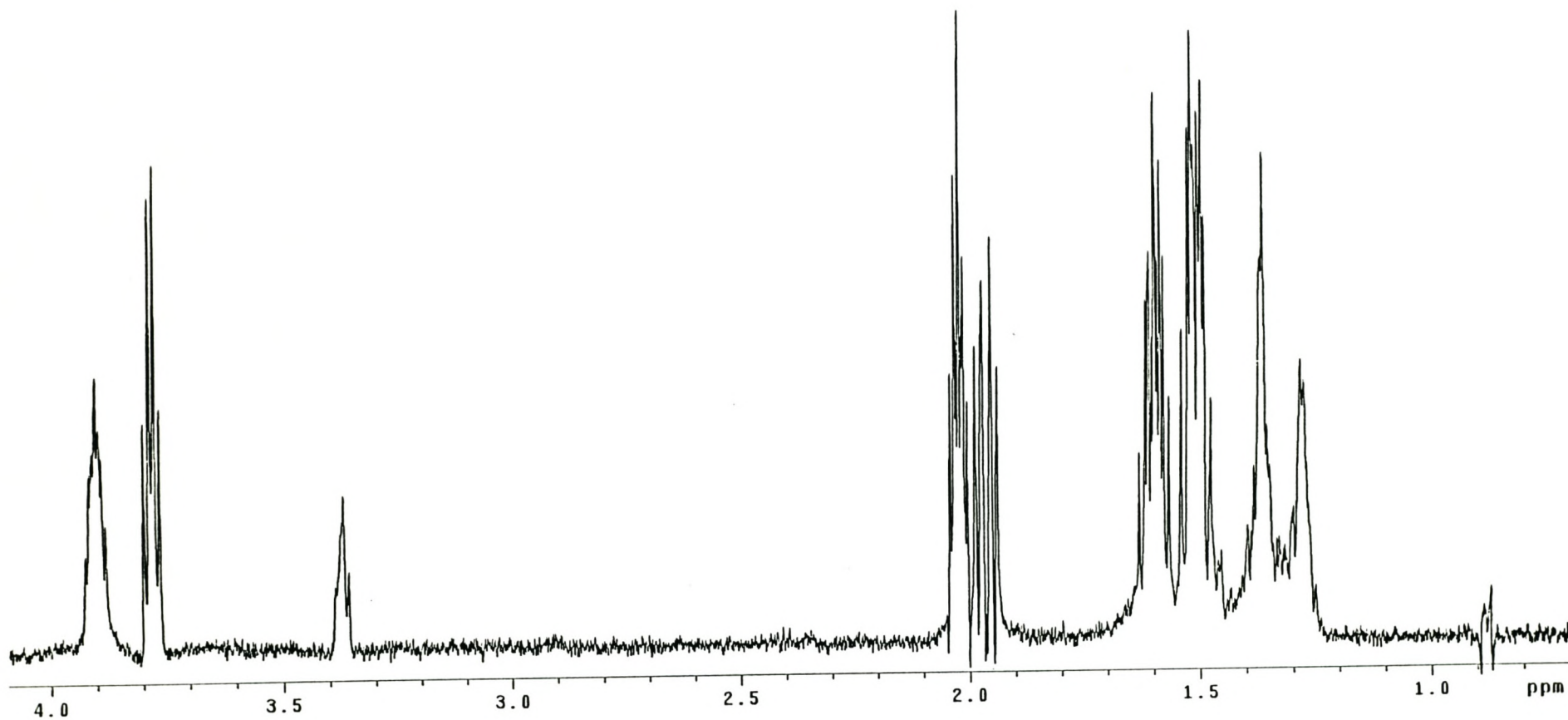
sel bestr by 1.59

hscs 20.10.2000

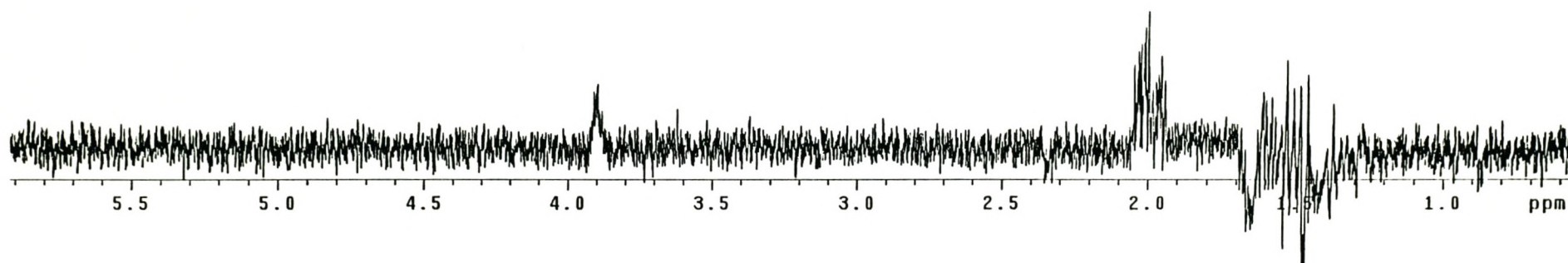
Pulse Sequence: tocsy1d_da



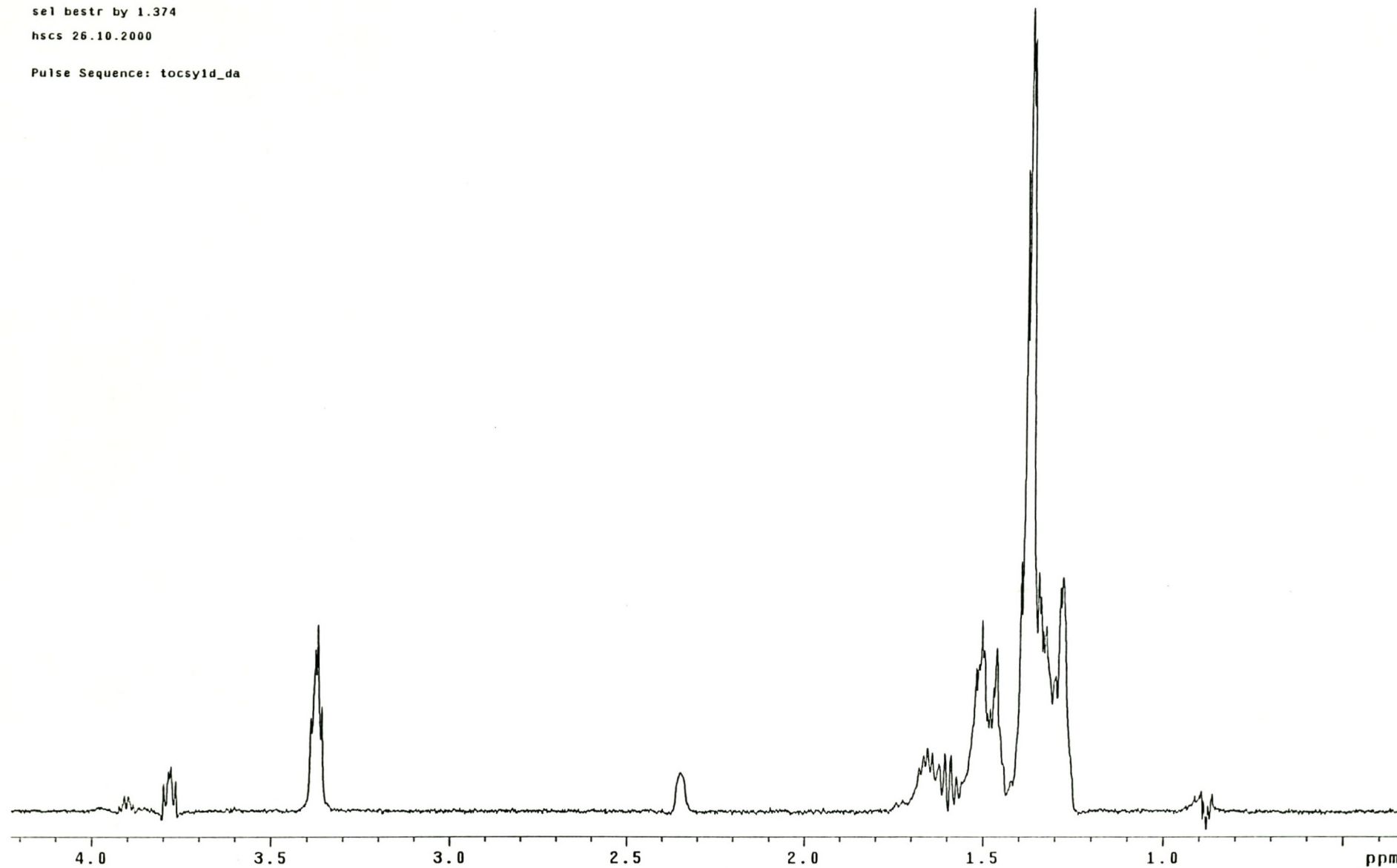
Figuur 2.107: 600 MHz 1D ^1H TOCSY KMR spektrum van Fraksie 5 met selektiewe bestraling by δ_{H} 1.60.



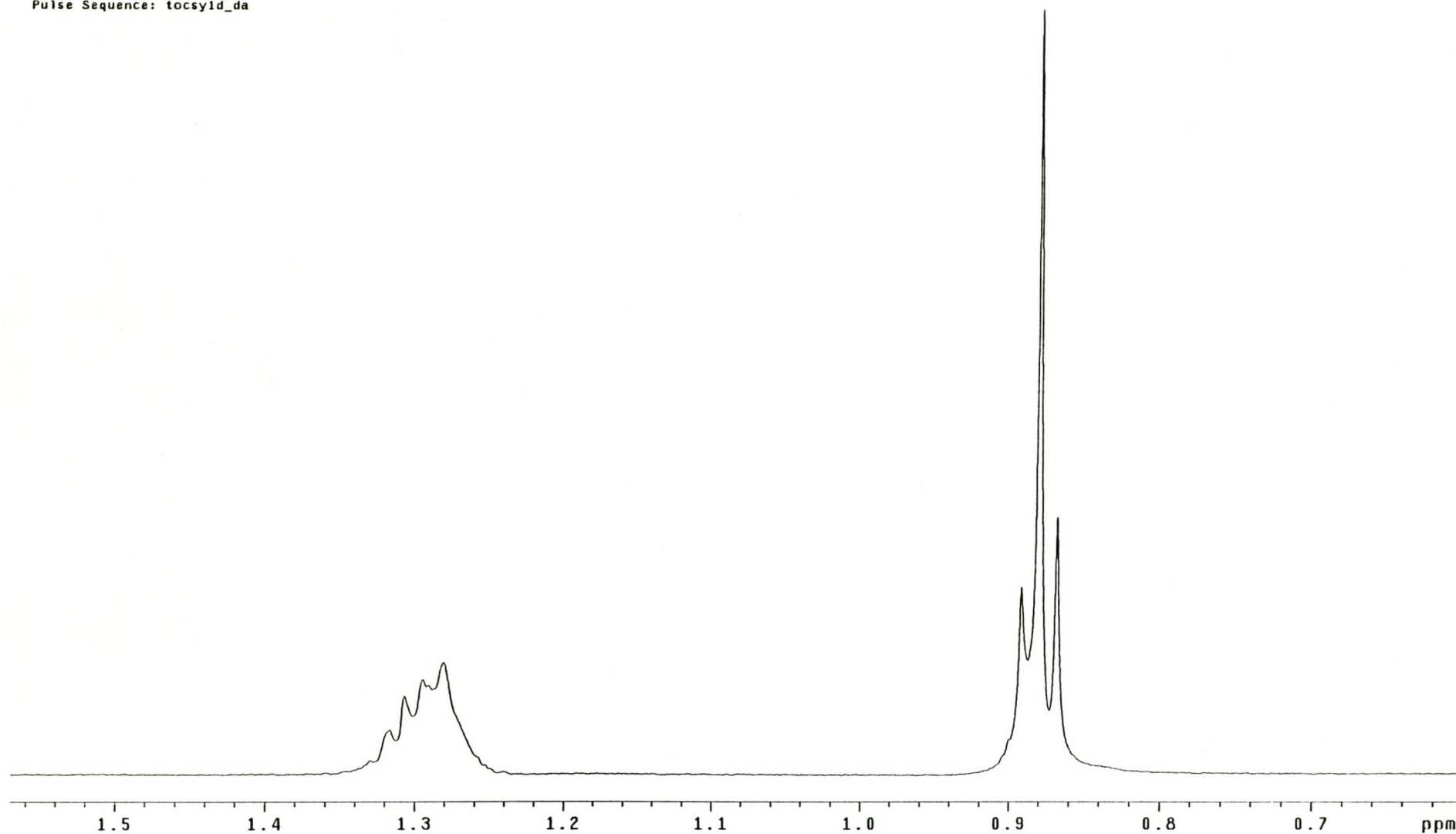
Figuur 2.108: 600 MHz 1D ¹H TOCSY KMR spektrum van Fraksie 5 met selektiewe bestraling by δ_H 1.51.



Figuur 2.109: 600 MHz 1D ^1H TOCSY KMR spektrum van Fraksie 5 met selektiewe bestraling by δ_{H} 1.46.



Figuur 2.110: 600 MHz 1D ^1H TOCSY KMR spektrum van Fraksie 5 met selektiewe bestraling by δ_{H} 1.37.



Figuur 2.111: 600 MHz 1D ¹H TOCSY KMR spektrum van Fraksie 5 met selektiewe bestraling by δ_H 0.88.

Verwysings: Hoofstuk 2

1. "Suní", 24 Maart 1999, <http://africanhunting.com.htm>, 28 Maart 1999.
2. Lawson, D., "Ecology and Conservation of Suni in Natal", Ph.D-proefskrif, Universiteit van Natal (1986), p11-14, 45-53.
3. Stuart, C. en Stuart, T., "Veldgids tot die Soogdiere van Suider-Afrika", Struik Uitgewers (1988), p214-215.
4. Somers, M., Anne, O., Rasa, E. en Apps, P. J., *Z. Säugertierkunde* **55**, 340-352 (1988).
5. Verwysing 2, p86-89.
6. Skinner, J. D. en Smithers, R. H. N., "The Mammals of the Southern African Subregion", Universiteit van Pretoria (1990), p645-647.
7. Stander, M. A., Chemiese Karakterisering van die Preorbitale Afskeiding van die Suni, *Neotragus Moschatus*", M.Sc-skripsie, Universiteit van Stellenbosch (1997), p27-32.
8. Pretorius, Q., Pretorius, B. P. en Dannhauser, C. S., *Koedoe* **39(1)**, 123-126 (1996).
9. Rodrigues, J., *Custos Jan* **1995**, 14-17.
10. "Suní. *Neotragus moschatus*", <http://www.ten.org/tsites/ewt/threatened/mvulnerable.html>, 28 Maart 1999.
11. Verwysing 2, p139-143.
12. *Zoon* **1991**, 13.
13. *Zoon* **32**, 12-13 (1989).

14. Heinechen (1972) verwysing uit Verwysing 6, p645-647.
15. Somers, M., *Custos* **21**(11), 16-17 (1993).
16. Le Roux, M., "Reuksintuiglike Kommunikasie: Chemiese Samestelling van Eksokriene Klierafskeidings van die Bontebok (*Damaliscus dorcas dorcas*), Springbok (*Antidorcas marsupialis*) en Grysbok (*Racipherus melanotis*)", Ph.D.-proefskrif, Universiteit van Stellenbosch (1980), p68-76.
17. Greyling, J., "Chemiese Karakterisering van die Preorbitale Afskeiding van die Steenbok, *Raphicerus campestris*, en die Rooiduiker, *Cephalophus natalensis*", Ph.D.-proefskrif, Universiteit van Stellenbosch (1992), p107-133.
18. Nell, A. E., "Reuksintuiglike Kommunikasie: Chemiese Karakterisering van die Interdigitale en Preorbitale Afskeidings van die Bontebok, *Damaliscus dorcas dorcas*, en die Blesbok, *Damaliscus dorcas Phillipsi*", Ph.D.-proefskrif, Universiteit van Stellenbosch (1992), p114-132.
19. Spiteller, G., "Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen", Verlag Chemie, GmbH, Karlsruhe/Baden (1966), p185.
20. Smit, D., "Olfactory Communication: Chemical Characterization of the Ventral Gland and Supplementary Sacculi Secretions of the Dwarf Hamster, *Phodopus sungorus sungorus*", Ph.D.-proefskrif, Universiteit van Stellenbosch (1997), p68-84.
21. Budzikiewicz, H., Djerassi, C., en Williams, D., H., "Mass Spectrometry of Organic Compounds", Holden-Day Inc, San Francisco (1967), p184-185.
22. Spiteller, G., "Interpretation of Mass Spectra Obtained from Natural Sources Especially those of Aliphatic Compounds", Kursus aangebied deur die Universiteit van Stellenbosch (1994), p37.
23. Verwysing 21, p176.

24. Verwysing 22, p35-37.
25. Verwysing 22, p30.
26. McLafferty, F. W., Turecek, F., "Interpretation of Mass Spectra" 4th edition, University Science Books, California (1993), p259.
27. Maccoll, A., *Org. Mass Spec.*, **23**, 381 (1988).
28. Verwysing 23, p214-218.
29. Verwysing 26, p195.
30. Verwysing 20, p60-65.
31. Verwysing 17, p84-86.
32. Beynon, J. H., Job, B. E. en Williams, A. E., *Z. Naturforsch.* **20a**, 883 (1965).
33. Verwysing 21, p219.
34. LEC-databasis op rekenaar.
35. Stenhagen, E., Abrahamsson, S. en McLafferty, F. W., "Registry of Mass Spectral Data" Vol 4, John Wiley & Sons, New York (1974), p2545.
36. Verwysing 17, p141.
37. Nair, P. P. en Luna, Z., *Arch. Biochem. Biophys.* **127**, 413 (1968), verwysing uit Verwysing 18, p240.
38. NBS-databasis op rekenaar.

39. Scheppele, S. E., Mitchum, R. K., Rudolph, C. J., Kinneberg, K. I. En Odell, G. V., *Lipids* **7**, 297 (1972).
40. Ryhage, R. en Stenhagen, E., *J. Lipid Res.* **1**, 361 (1960).
41. Friedland, S. S., Lane, G. H., Longman, R. T., Train, K. E. en O'Neal, M. J., *Anal. Chem.* **31**, 169 (1959).
42. Verwysing 18, p155-160.
43. Verwysing 17, p137-143.
44. Brooks, C. J. W., Horning, E. C. en Young, J. S., *Lipids* **3**, 391 (1968).
45. Verwysing 7, p29-82 & opsomming
46. ChemWindow Version 5.0.1, 1995-1997, SoftShell International Ltd., Bio-Rad Laboratories, Grand Junction, CO.
47. Spies, H. S. C., "KMR", Kursus aangebied as gedeelte van Chemie 714 aan die Universiteit van Stellenbosch (1997), p 46-47.
48. SPECINFO, STN International, Karlsruhe, Duitsland.
49. Lin, J.-T., McKeon, T. A., Stafford, A. E., *Journal of Chromatography A* (**669**), 85-91 (1995).
50. ACD/ILab Web, <Http://www2.acdlabs.com/ilab>, 20/01/2000.
51. ACD/ILab Web, <Http://www2.acdlabs.com/ilab>, 09/01/2001.

HOOFSTUK 3

EKSPERIMENTEEL

Alle glasware is vooraf in 'n muffeloond verhit tot 500°C om moontlike spore van geabsorbeerde organiese materiaal te verwyder. Spuite is skoongemaak deur dichlorometaan (residu analise-gehalte, Merck) onder vakuum daardeur te suig, terwyl die naalde en suierstafies met dichlorometaan afgespoel is.

VERSAMELING EN MONSTERVOORBEREIDING

'n Paar suni's word in die Tygerberg Dieretuin aangehou en die monsters is daar versamel. Aanvanklik is die preorbitale afskeiding van die suni-ooi versamel deur die afskeiding met 'n teflonlepeltjie uit die klierholtes te skep en oor te plaas in 'n Reacti Vial. Hierdie afskeiding is met ongeveer 500 µl dichlorometaan geëkstraheer deur die versamelde materiaal met 'n dun glasstafie (0.5 mm deursnee) te roer tot 'n homogene suspensie en dit daarna te sentrifugeer by ongeveer 2000 r.p.m. vir 5 minute. Die dichlorometaanlaag, wat onder vorm, is met behulp van 'n spuit na 'n skoon Reacti Vial oorgeplaas, by -30°C gestoor en vir analyses gebruik.

Die preorbitale afskeiding van die suni-ooi is later volgens 'n alternatiewe metode met behulp van klein stukkie chirurgiese gaas versamel, waarna die stukkie gaas in 'n klein flessie geplaas is. Die gaas is met dichlorometaan benat, vir 'n kort tydjie gesentrifugeer teen ongeveer 1000 r.p.m. om beter kontak tussen oplosmiddel en gaas te berwerkstellig en weer toegelaat om in die dichlorometaan te week. Daarna is die nat gasies oorgeplaas na 'n klein sinterglastregtertjie wat in 'n Reacti-Vial pas. Die Reacti-Vial met die regtertjie is teen 2000 r.p.m. vir ongeveer 5 minute gesentrifugeer, waartydens die dichlorometaan-ekstrak onder in die Reacti-Vial versamel het en die gaas en ander onsuiverhede in die sintertregtertjie teruggehou is. In sommige gevalle is die gaas weer benat en bogenoemde proses herhaal om volledige ekstraksie te verseker. Die ekstrak is by -30°C gestoor.

Vir latere HPLC-analises is dieselfde ekstraksieprosedure as voorheen gebruik. Die dichlorometaan is ingedamp, metanol by die droë ekstrak gevoeg en die vorming van 'n wit vetlagie waargeneem. Na sentrifugering het die metanol-lagie bo gelê en die onderste vetlagie is uitgesuig, weer ingedamp en nog metanol daarby gevoeg om alle moontlike materiaal te herwin.

ANALITIESE TEGNIEKE

Gaschromatografiese Analises (GC)

Gaschromatografiese analises is uitgevoer met 'n Carlo Erba 4200 gaschromatograaf, toegerus met 'n vlam-ionisasie-detektor en 'n Grob-inlaatsisteem. Die kolom (40 m x 0.3 mm) wat gebruik is, is vervaardig deur die Laboratorium vir Ekologiese Chemie en is belaag met 0.25 μm film van die apolêre stasionêre fase PS-089-OH, 'n silanol-getermineerde (95%)-metiel-(5%)-fenielpolisiloksaan kopolimeer. Helium is as draergas gebruik teen 'n liniêre vloeispoed van 28.6 cm/s. Monsters is met 'n inlaatstroomverdeling van 1:10 ingespuut by 'n oondtemperatuur van 28°C. Die oond is daarna verhit tot 40°C en die volgende temperatuurprogram gebruik: 40°C (0 min)–280°C (60 min) teen 2°C/min. Die inlaattemperatuur was 220°C en dié van die vlam-ionisasie-detektor 280°C.

Gaschromatografie-Massaspektrometrie (GC-MS)

GC-MS analises is gedoen met behulp van 'n Carlo Erba QMD 1000 GC-MS sisteem. Hierdie sisteem bestaan uit 'n Carlo Erba 5300 gaschromatograaf en 'n VG Analytical TRIO 1 kwadropoolmassaspektrometer wat deur middel van 'n tussenvlak gekoppel is. Dieselfde kolom en draergas wat vir die GC-analises gebruik is, is vir die GC-MS-analises gebruik. Aanvanklik is die volgende temperatuurprogram gebruik: 40°C (0 min)–270°C (60 min) teen 2°C/min. Om die suiwerheid van fraksies te bepaal en die verloop van isoleringsprosedures te volg, is 'n temperatuurgradiënt van 4°C/min soms gebruik. Die finale temperatuur is later na 280°C verhoog. Die brontemperatuur was 100°C en die tussenvlaktemperatuur 270°C. 'n Ionisasiespanning van 70 eV is aangewend en daar is afgetas oor 'n massagebied van 25 tot 550 Da.

Chemiese Ionisasie Massaspektrometrie (CI-MS)

Inligting in verband met die molekulêre massas van twee van die hoofkomponente is verkry deur gebruik te maak van chemiese ionisasie (CI) met metaan as reaktantgas. Bogenoemde GC-MS-sisteem is vir hierdie doel gebruik.

Gaschromatografie-Infrarooispektroskopie (GC-FTIR)

'n GC-FTIR-analise van 'n ekstrak van die preorbitale afskeiding van die suni-ooi is in die laboratorium van die firma *R & R Tabak* in Stellenbosch met 'n Hewlett-Packard 5965 Infrarooi Detektor GC-FTIR-sisteem uitgevoer.

Hoëdruk Vloeistofchromatografie (HPLC)

Die preparatiewe skeiding is met 'n *Waters 2690 Separations Module* hoë-drukvloeistofchromatograaf toegerus met 'n *Waters 996 diodereeksdetektor* (PDA-detektor) uitgevoer. Die rekenaarprogram *Millenium Version 2.15.01* is vir die verwerking van die data gebruik. 'n Omgekeerde fase C₁₈-kolom, aanvanklik 'n Bio-Sil C₁₈ HL kolom (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) wat later vervang is met 'n Vydac A C₁₈-kolom (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), is gebruik in die skeiding. Die kolomkompartement-temperatuur was 25°C en die vloeispoed 1.0 ml/min.

Die kolom is aanvanklik gekondisioneer met 85 % metanol (PESTANAL, Riedel-de Haën, AG) (wat 0.05 % ysasynsuur bevat) en 15 % gedeïoniseerde water (wat 0.05 % ysasynsuur bevat). Daar is begin met 'n gradiënt van 85 % metanol (0.05 % ysasynsuur) tot 100 % metanol (0.05 % ysasynsuur) oor 'n tydperk van 40 minute. Die gradiënt was egter te vlak en na kondisionering van die kolom met 60 % metanol en 40 % water is die gradiënt verander na 60 % metanol (0.05 % ysasynsuur) tot 100 % metanol (0.05 % ysasynsuur) oor 'n tydperk van 20 minute. Die PDA-detektor is gestel om van 200-600 nm af te tas en die beste resultate is verkry deur vloeistof-chromatogramme by 'n golflengte van 205 nm uit te stip¹.

Kern Magnetiese Resonansie (KMR)

^1H - en ^{13}C -KMR spektra is met 'n Varian VXR-300 spektrometer by 299.905 MHz en 75.42 MHz onderskeidelik opgeneem. Alle spektra is opgeneem by 25°C. Die APT-tegniek is verskeie kere gebruik om multiplisiteite in die ^{13}C -spektrum te bepaal. Deuteriochloroform (Merck, 99.8% isotopiese suiwerheid) is as oplosmiddel en TMS as interne standaard gebruik.

KMR spektra, wat ^1H -, ^{13}C -, APT-, DEPT-, 2D COSY-, 2D HMBC-, 2D HSQC- en 1D TOCSY-analises insluit, is met behulp van die Varian INOVA-600 KMR-spektrometer by onderskeidelik 599.980 MHz en 150 MHz by 25°C opgeneem met TMS as interne standaard en deuteriochloroform as oplosmiddel.

Hoë Resolusie Massaspektrometrie (HRMS)

Elektron Impak Hoë Resolusie Massaspektrometrie-analises (EI-HRMS) is uitgevoer met 'n hoë-resolusie AMD 604 massaspektrometer. Die oplosvermoë was 3000 en daar is oor 'n massagebied van 40 tot 300 Da afgetas.

ISOLERING VAN SURE DEUR MIDDEL VAN SOUTVORMING

Sure is aanvanklik met NaOH-oplossing uit 'n CDCl_3 -ekstrak van die preorbitale afskeiding geëkstraheer en die sure met verdunde H_2SO_4 -oplossing uit die geïsoleerde oplossing van karboksielsuursoute vrygestel. Daar is egter vermoed dat die betrokke basis en/of suur te sterk kan wees en tot die ontbinding of omskakeling van die verlangde hoofkomponente aanleiding kan gee. Daar is dus gepoog om die hoofkomponente met behulp van Na_2CO_3 -oplossing as basis en verdunde H_3PO_4 as suur te isoleer.

In die onderstaande beskrywing van hierdie eksperimente word die NaOH/ H_2SO_4 -kombinasie as A en die Na_2CO_3 / H_3PO_4 -kombinasie as B beskryf.

Die prosedure was as volg: Die basis [A. NaOH (3M, drie of vier druppels), B. Na₂CO₃ (4.24mg in 20µl H₂O)] is gevoeg by 100µl van die CDCl₃-ekstrak van die preorbitale afskeiding van die suni-ooi. (Hierdie CDCl₃-ekstrak is verkry soos voorheen beskryf deur CDCl₃ te gebruik in plaas van dichlorometaan as oplosmiddel). 'n Duidelike skeiding tussen die CDCl₃- en die waterlae het gevorm. Die onderste laag (CDCl₃) is gewas met H₂O tot neutraal en met behulp van GC-MS geanaliseer (Fig. 2.74). Die boonste laag (die waterlaag wat die sure in soutvorm bevat) is na 'n skoon Reacti Vial oorgebring en aangesuur [A. H₂SO₄ (3 druppels), B. H₃PO₄ (4mg in 20µl H₂O), toets met universele indikator]. Die aangesuurde waterlaag is een maal met CDCl₃ geëkstraheer om die sure in die CDCl₃-laag te isoleer, waarna die CDCl₃ ekstrak met water gewas is tot neutraal en aan 'n GC-MS analise onderwerp is (Fig. 2.73-2.75).

Verwysings: Hoofstuk 3

1. Lin, J.-T., Mckee, T. A. en Stafford, A. E., *Journal of Chromatography A* **669**, 85-91 (1995).